

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

Jc821 U.S. PTO
09/852922
05/10/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2000年 5月11日

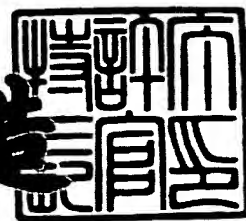
出 願 番 号
Application Number: 特願2000-138796

出 願 人
Applicant (s): 東洋紡績株式会社

2001年 1月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3109103

【書類名】 特許願

【整理番号】 CN00-0300

【提出日】 平成12年 5月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/12
C12N 15/54
C12N 15/67

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 黒板 敏弘

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 北林 雅夫

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 石田 由和

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 小松原 秀介

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 西矢 芳昭

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社

敦賀バイオ研究所内

【氏名】 川上 文清

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 川村 良久

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市藤白台 2 - 2 8 - 1 1

【氏名】 今中 忠行

【特許出願人】

【識別番号】 000003160

【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

【代表者】 津村 準二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 000619

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 改変された耐熱性DNAポリメラーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ1 (Exo1) 領域を含有するDXEXXXH (D: アスパラギン酸、E: グルタミン酸、H: ヒスチジン、X: 任意のアミノ酸) 配列のうち、ヒスチジンが他のアミノ酸に置換されたことを特徴とする耐熱性DNAポリメラーゼ。

【請求項2】 DXEXXXH配列のうちのヒスチジンがアスパラギン酸、グルタミン酸、チロシン、アラニン、リジン、及びアルギニンのいずれかのアミノ酸に置換された請求項1記載の耐熱性DNAポリメラーゼ。

【請求項3】 下記理化学的性質を有する請求項1記載の耐熱性DNAポリメラーゼ。

DNA合成速度: 少なくとも20塩基/秒

熱安定性: pH 8.8 (25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で10%以上の残存活性を保持することができる

【請求項4】 下記理化学的性質を有する請求項3記載の耐熱性DNAポリメラーゼ。

DNA合成速度: 少なくとも30塩基/秒

熱安定性: pH 8.8 (25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる

アミノ酸配列: 配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソ1 (EX01)領域を含有するアミノ酸配列中、DXEXXXH (D: アスパラギン酸、E: グルタミン酸、H: ヒスチジン、X: 任意のアミノ酸) 配列のうち、ヒスチジンを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項5】 下記理化学的性質を有する請求項3記載の耐熱性DNAポリメラーゼ。

DNA合成速度: 少なくとも30塩基/秒

熱安定性: pH 8.8 (25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で60%以

上の残存活性を保持することができる

アミノ酸配列：配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項 6】 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンをアスパラギン酸、グルタミン酸、チロシン、アラニン、リジン、及びアルギニンのいずれかのアミノ酸に置換した請求項 5 記載の耐熱性 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 7】 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンをアスパラギン酸に置換した請求項 6 記載の耐熱性 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 8】 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンをグルタミン酸に置換した請求項 6 記載の耐熱性 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 9】 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンをチロシンに置換した請求項 6 記載の耐熱性 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 1 0】 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンをアラニンに置換した請求項 6 記載の耐熱性 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 1 1】 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンをリジンに置換した請求項 6 記載の耐熱性 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 1 2】 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンをアルギニンに置換した請求項 6 記載の耐熱性 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 1 3】 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性 DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ 1 (Exo 1) 領域を含有する DXEXXXH (D: アスパラギン酸、E: グルタミン酸、H: ヒスチジン、X: 任意のアミノ酸) 配列のうち、ヒスチジンが他のアミノ酸に置換された耐熱性 DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子。

【請求項 1 4】 下記理化学的性質を有する改変された耐熱性 DNA ポリメラーゼをコードする請求項 1 3 記載の遺伝子。

DNA 合成速度：少なくとも 2 0 塩基/秒

熱安定性：pH 8. 8 (2 5℃での測定値)にて 9. 5℃、6 時間の処理で 1 0 % 以上の残存活性を保持することができる

【請求項15】 下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼをコードする請求項13記載の遺伝子。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソ1 (EX01)領域を含有するアミノ酸配列中、DXEXXXH (D:アスパラギン酸、E:グルタミン酸、H:ヒスチジン、X:任意のアミノ酸)配列のうち、ヒスチジンを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項16】 下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼをコードする請求項13記載の遺伝子。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配中、第147番目のヒスチジンを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項17】 請求項13～16のいずれかに記載の遺伝子を発現ベクターに挿入されてなる遺伝子組換えベクター。

【請求項18】 ベクターがpLED-MIもしくはpBluescript由来のベクターである請求項17記載の遺伝子組換えベクター。

【請求項19】 請求項17又は18に記載の遺伝子組換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換した組換え細胞。

【請求項20】 宿主細胞がエシェリシア・コリ (*Escherichia coli*) である請求項19記載の組換え細胞。

【請求項21】 請求項20記載の組換え細胞を培養し、培養物から耐熱性DNAポリメラーゼを採取することを特徴とする耐熱性DNAポリメラーゼの製造方法。

【請求項22】 DNAを鋳型とし、プライマー、dNTP、及び請求項1～12のいずれかに記載の耐熱性DNAポリメラーゼを反応させることによりプ

ライマーを伸長させてDNAプライマー伸長物を合成することを特徴とする核酸増幅方法。

【請求項23】 プライマーが2種のオリゴヌクレオチドであって、一方は他方のDNA伸長物に相補的である請求項22記載の核酸増幅方法。

【請求項24】 加熱および冷却を繰り返す請求項22記載の核酸増幅方法。

。

【請求項25】 一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物である2種のプライマー、dNTP、および請求項1～12のいずれかに記載の耐熱性DNAポリメラーゼ、2価イオン、1価イオン及び緩衝液を含むことを特徴とする核酸増幅用試薬。

【請求項26】 一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物である2種のプライマー、dNTP、請求項1～12のいずれかに記載の耐熱性DNAポリメラーゼ、マグネシウムイオン、アンモニウムイオン及び／又はカリウムイオン、BSA（牛血清アルブミン）、非イオン性界面活性剤、及び緩衝液を含有することを特徴とする核酸増幅用試薬。

【請求項27】 一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物である2種のプライマー、dNTP、請求項1～12のいずれかに記載の耐熱性DNAポリメラーゼ、マグネシウムイオン、アンモニウムイオン及び／又はカリウムイオン、BSA、非イオン性界面活性剤、緩衝液、及び該耐熱性DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性及び／又は3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を抑制する活性を有する抗体を含有する核酸増幅用試薬。

【請求項28】 請求項1～12のいずれかに記載の耐熱性DNAポリメラーゼを1種以上混合されたことを特徴とするDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項29】 DNAを鋳型として、変異導入プライマー、dNTP及び請求項1～12のいずれかに記載の耐熱性DNAポリメラーゼを反応させることによりプライマーを伸長させてDNAプライマー伸長物を合成することを特徴とする遺伝子変異導入方法。

【請求項30】 変異導入プライマー、dNTP、及び請求項1～12のいずれかに記載の耐熱性DNAポリメラーゼ含んでなることを特徴とする遺伝子変

異導入用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)における増幅効率及び／又は正確性の変化した耐熱性DNAポリメラーゼ及びその製法に関する。更には、該耐熱性DNAポリメラーゼを用いた核酸の増幅方法、並びに該DNAポリメラーゼを含有する試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、PCRは生化学、分子生物学および臨床病理分野における研究、検査において必須の技術の一つとなっている。PCRの特徴は、耐熱性DNAポリメラーゼを用いるところにあり、現在最も頻繁に利用されているDNAポリメラーゼは主として、サーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) 由来の耐熱性DNAポリメラーゼ (Taq DNA polymerase) やサーマス・サーモティカス (*Thermus thermophilus*) 由来の耐熱性DNAポリメラーゼ (Tth DNA polymerase) などのPol I型と呼ばれる耐熱性DNAポリメラーゼである。Pol I型DNAポリメラーゼの特徴は、増幅効率が良く、条件設定が容易であるところにある。しかしながら、増幅の際に核酸の取り込みの正確性(fidelity)が悪いという問題があり、増幅された遺伝子をクローニングするような場合には適していないとされている。

【0003】

一方、超好熱始原菌由来の α 型と呼ばれるDNAポリメラーゼ、例えばパイロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) 由来の耐熱性DNAポリメラーゼ (Pfu DNAポリメラーゼ; WO92/9689号公報、特開平5-328969号公報)、サーモコッカス・リトラリス (*Thermococcus litoralis*) 由来の耐熱性DNAポリメラーゼ (Ti (Vent)ポリメラーゼ、特開平6-7160号公報)、パイロコッカス・コダカラエンシス (*Pyrococcus kodakaraensis*) KOD1 (旧名: *Pyrococcus* sp. KOD1) 由来の耐熱性DNAポリメラーゼ (KOD DNAポリメラーゼ; 特開平7-298879号公報)なども知られている。これら、

α 型DNAポリメラーゼは3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性(Proof reading活性)を有し、核酸の取り込み際の正確性は、Taq DNAポリメラーゼなどのpolI型DNAポリメラーゼに比べて優れているという特徴を有する。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、 α 型DNAポリメラーゼを用いたPCR増幅においては、その増幅効率が十分でないなどの問題が存在している。また、これらDNAポリメラーゼには、PCRの反応時間、酵素量及びプライマー濃度等の至適条件の幅が狭いものが多い。

α 型DNAポリメラーゼにおけるPCR増幅における上記問題点の原因として、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性の強さが関与していることが考えられる。すなわち、PCR時にプライマーなどがその3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性によって削られることにより、PCRにおける増幅効率が低下すると考えられている。また、 α 型DNAポリメラーゼは単一タンパク質内に3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を示す領域と、DNAポリメラーゼ活性を示す領域が存在するため、両活性はお互いに相互作用しており、それぞれの領域の核酸への親和性などの違いなどもPCR増幅に影響を及ぼしていると考えられる。

【0005】

3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性の発現を担っているDNAポリメラーゼのアミノ酸配列中には、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性発現に関与していると思われる高度に保存されたアミノ酸領域(EXOI(図1), EXOII, EXOIII)が存在していることが知られている。EXO I領域にはXDXEXモチーフ(D:アスパラギン酸、E:グルタミン酸、X:任意のアミノ酸)が存在し、アスパラギン酸とグルタミン酸はエキソヌクレアーゼ活性の発現に必須であることが知られている。これらのアミノ酸配列におけるアスパラギン酸とグルタミン酸を中性のアミノ酸であるアラニンに置換することによって、エキソヌクレアーゼ活性を欠失または1万分の1以下に低減できることが報告されている(Kongら(1993)、J urnal of Biological Chemistry, vol. 268,1965-1975)。しかしながら、エキソヌクレアーゼ活性を欠失又は1万分の1以下に低減させることにより、 α 型DNAポリメラーゼ

の特徴であるDNA複製時の正確性も同時に失われるという問題が存在した。

【0006】

さらに、KOD DNAポリメラーゼにおける上記XDXEXモチーフのXで示されるアミノ酸を任意のアミノ酸に置換することにより、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を段階的に減衰させる試みも行われている（特開平10-42871号公報）。この方法によると、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が低下するにつれてPCR効率の上昇と増幅における正確性(fidelity)の低下が同時に観察される。したがって、この方法を用いるには正確性が損なわれない程度に3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性の低下したクローンを用いることが重要となる。しかしながら、この方法によって得られた酵素、例えばKOD DNAポリメラーゼの第142番目のイソロイシンをグルタミンに置換した変異体(IQ)や、リジンに置換した変異体(IK)は、必ずしもコピー数の低いDNAからの増幅率が必ずしも良いとは言えないことが、優れたPCR効率を有する耐熱性ポリメラーゼ開発の障害となっていた（図3）。

また特開平10-42871号公報によれば、この方法を用いる限りにおいて3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性（proof reading活性）の上昇した変異体を得ることは困難である。このことは、この方法に従っては野生型KOD DNAポリメラーゼ以上に正確性に優れる酵素の取得が困難であることを示唆しているものと思われる。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは本課題を解決するためKOD DNAポリメラーゼの種々の変異体を作製し、鋭意検討を重ねた結果、EX0I領域中のXDXEXモチーフのグルタミン酸から数えて4つ目のヒスチジン残基（147番目；以下、Hとも示す）を種々のアミノ酸に置換することにより、様々な強さの3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性、PCR効率及び正確性を示す耐熱性DNAポリメラーゼの取得が可能であることを見出し、本発明に到達した（以下、このヒスチジンを含むモチーフをDXEXXHモチーフと呼ぶ）。

【0008】

すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ1 (Exo1) 領域を含有するDXEXXXH (D:アスパラギン酸、E:グルタミン酸、H:ヒスチジン、X:任意のアミノ酸) 配列のうち、ヒスチジンが他のアミノ酸に置換されたことを特徴とする耐熱性DNAポリメラーゼ。

(2) DXEXXXH配列のうちのヒスチジンがアスパラギン酸、グルタミン酸、チロシン、アラニン、リジン、及びアルギニンのいずれかのアミノ酸に置換された(1)の耐熱性DNAポリメラーゼ。

(3) 下記理化学的性質を有する(1)の耐熱性DNAポリメラーゼ。

DNA合成速度: 少なくとも20塩基/秒

熱安定性: pH 8.8 (25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で10%以上の残存活性を保持することができる。

(4) 下記理化学的性質を有する(3)の耐熱性DNAポリメラーゼ。

DNA合成速度: 少なくとも30塩基/秒

熱安定性: pH 8.8 (25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる

アミノ酸配列: 配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソ1 (EX01)領域を含有するアミノ酸配列中、DXEXXXH (D:アスパラギン酸、E:グルタミン酸、H:ヒスチジン、X:任意のアミノ酸) 配列のうち、ヒスチジンを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

(5) 下記理化学的性質を有する(3)の耐熱性DNAポリメラーゼ。

DNA合成速度: 少なくとも30塩基/秒

熱安定性: pH 8.8 (25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる

アミノ酸配列: 配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第147番目のヒスチジンを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第147番目のヒスチジンをアスパラギン酸、グルタミン酸、チロシン、アラニン、リジン、及びアルギニンのいずれかのアミノ酸に置換した(5)の耐熱性DNAポリメラーゼ。

(7) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンをアスパラギン酸に置換した (6) の耐熱性 DNA ポリメラーゼ。

(8) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンをグルタミン酸に置換した (6) の耐熱性 DNA ポリメラーゼ。

(9) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンをチロシンに置換した (6) の耐熱性 DNA ポリメラーゼ。

(10) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンをアラニンに置換した (6) の耐熱性 DNA ポリメラーゼ。

(11) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンをリジンに置換した (6) の耐熱性 DNA ポリメラーゼ。

(12) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列中、第 1 4 7 番目のヒスチジンをアルギニンに置換した (6) の耐熱性 DNA ポリメラーゼ。

(13) 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性 DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ 1 (Exo 1) 領域を含有する DXEXXXH (D: アスパラギン酸、E: グルタミン酸、H: ヒスチジン、X: 任意のアミノ酸) 配列のうち、ヒスチジンが他のアミノ酸に置換された耐熱性 DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子。

(14) 下記理化学的性質を有する改変された耐熱性 DNA ポリメラーゼをコードする (13) の遺伝子。

DNA 合成速度: 少なくとも 20 塩基/秒

熱安定性: pH 8.8 (25℃での測定値) にて 95℃、6 時間の処理で 10% 以上の残存活性を保持することができる

(15) 下記理化学的性質を有する改変された耐熱性 DNA ポリメラーゼをコードする (13) の遺伝子。

DNA 合成速度: 少なくとも 30 塩基/秒

熱安定性: pH 8.8 (25℃での測定値) にて 95℃、6 時間の処理で 60% 以上の残存活性を保持することができる

アミノ酸配列: 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列のエキソ 1 (EX01) 領域を含有するアミノ酸配列中、DXEXXXH (D: アスパラギン酸、E: グルタミン酸、H: ヒスチジ

ン、X: 任意のアミノ酸) 配列のうち、ヒスチジンを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

(16) 下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼをコードする(13)の遺伝子。

DNA合成速度: 少なくとも30塩基/秒

熱安定性: pH 8.8 (25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる

アミノ酸配列: 配列番号2に記載のアミノ酸配中、第147番目のヒスチジンを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

(17) (13) ~ (16) のいずれかの遺伝子を発現ベクターに挿入されてなる遺伝子組換えベクター。

(18) ベクターがpLED-MIもしくはpBluescript由来のベクターである(17)の遺伝子組換えベクター。

(19) (17) 又は(18)の遺伝子組換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換した組換え細胞。

(20) 宿主細胞がエシェリシア・コリ (*Escherichia coli*) である請求項19記載の組換え細胞。

(21) (20)の組換え細胞を培養し、培養物から耐熱性DNAポリメラーゼを採取することを特徴とする耐熱性DNAポリメラーゼの製造方法。

(22) DNAを鋳型とし、プライマー、dNTP、及び(1) ~ (12)のいずれかの耐熱性DNAポリメラーゼを反応させることによりプライマーを伸長させてDNAプライマー伸長物を合成することを特徴とする核酸増幅方法。

(23) プライマーが2種のオリゴヌクレオチドであって、一方は他方のDNA伸長物に相補的である(22)の核酸増幅方法。

(24) 加熱および冷却を繰り返す(22)の核酸増幅方法。

(25) 一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物である2種のプライマー、dNTP、および(1) ~ (12)のいずれかの耐熱性DNAポリメラーゼ、2価イオン、1価イオン及び緩衝液を含むことを特徴とする核酸増幅用試薬。

(26) 一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物である2種のプライマー、dNTP、(1)～(12)のいずれかの耐熱性DNAポリメラーゼ、マグネシウムイオン、アンモニウムイオン及び／又はカリウムイオン、BSA(牛血清アルブミン)、非イオン性界面活性剤、及び緩衝液を含有することを特徴とする核酸増幅用試薬。

(27) 一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物である2種のプライマー、dNTP、(1)～(12)のいずれかの耐熱性DNAポリメラーゼ、マグネシウムイオン、アンモニウムイオン及び／又はカリウムイオン、BSA、非イオン性界面活性剤、緩衝液、及び該耐熱性DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性及び／又は3'－5'エキソヌクレアーゼ活性を抑制する活性を有する抗体を含有する核酸増幅用試薬。

(28) (1)～(12)のいずれかの耐熱性DNAポリメラーゼを1種以上混合されたことを特徴とするDNAポリメラーゼ組成物。

(29) DNAを鋳型として、変異導入プライマー、dNTP及び(1)～(12)のいずれかの耐熱性DNAポリメラーゼを反応させることによりプライマーを伸長させてDNAプライマー伸長物を合成することを特徴とする遺伝子変異導入方法。

(30) 変異導入プライマー、dNTP、及び(1)～(12)のいずれかの耐熱性DNAポリメラーゼ含んでなることを特徴とする遺伝子変異導入用試薬。

【0009】

本発明においては、3'－5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼの該DXEXXXHモチーフのHをグルタミン酸やアスパラギン酸などの酸性アミノ酸に置換することにより、3'－5'エキソヌクレアーゼ活性の低下させることができる。

実際、KOD DNAポリメラーゼHE変異体(147番目のヒスチジンをグルタミン酸に置換)およびHD変異体(147番目のヒスチジンをアスパラギン酸に置換)は野生型KOD DNAポリメラーゼに比べて3'－5'エキソヌクレアーゼ活性がそれぞれ25%、6.25%程度と低下した(図2)。

また、本発明において、3'－5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性D

NAポリメラーゼの該DXEXXXHモチーフのヒスチジンをグルタミン酸やアスパラギン酸などの酸性アミノ酸や、チロシンやアラニンなどの中性アミノ酸に置換することによって、特に低いコピー数のDNAからのPCR増幅における効率を向上させることができる。

実際、KOD DNAポリメラーゼHE変異体(147番目のヒスチジンをグルタミン酸に置換)、HD変異体(147番目のヒスチジンをアスパラギン酸に置換)、HY変異体(147番目のヒスチジンをチロシンに置換)及びHA変異体(147番目のヒスチジンをアラニンに置換)においては、PCR効率の上昇を認めることが可能であった(図3、図4)。これら変異体のうち、特にHYにおいてはエキソヌクレアーゼ活性の顕著な低下は見られなかったことから(図2)、該DXEXXXHモチーフの第147番目のヒスチジンはエキソヌクレアーゼ活性の強弱とは独立してPCR効率を左右する役割も担っていることを示唆している。また、長いサイズのDNAの増幅においては、特に酸性アミノ酸に置換したHE変異体、HD変異体においてPCR効率が向上していることが確認された(図4)。

【0010】

更に、本発明においては、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性ポリメラーゼの該DXEXXXHモチーフのHをリジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸に置換することにより、耐熱性DNAポリメラーゼの3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性及び/又はPCR時における正確性を向上させることができる。

実際、本発明の検討において得られたKOD DNAポリメラーゼHK変異体(147番目のヒスチジンをリジンに置換)およびHR変異体(147番目のヒスチジンをアルギニンに置換)においては、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性の顕著な上昇を確認することができた(図2)。また、両変異体ともに野生型酵素に比べてPCR時の正確性の向上を確認することが可能であった(図5)。また、147番目のヒスチジンを上記以外のアミノ酸に置換することによっても新たな機能を付加することができる可能性のあることは容易に予想しうる。

【0011】

【発明の実施態様】

本発明の耐熱性DNAポリメラーゼは、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ1 (Exo 1) 領域を含有するDXEXXXH配列のうち、Hを他のアミノ酸に置換したことを特徴とする酵素である。エキソ1 (EXO 1) 領域を含有するDXEXXXHモチーフを有する耐熱性DNAポリメラーゼはその起源を問わないが、例えば、パイロコッカス・コダカラエンシスKOD1株由来のKOD DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス由来の耐熱性DNAポリメラーゼ、及びサーモコッカス・リトラリス由来の耐熱性DNAポリメラーゼなどが例示される。

該DXEXXXHモチーフの具体的な配列としては「DIETLYH」を挙げることができる。この配列はパイロコッカス・コダカラエンシスKOD1株及び、パイロコッカス・フリオサス由来のDNAポリメラーゼにおいて完全に保存されており、サーモコッカス・リトラリス由来のDNAポリメラーゼにおいても「DIETFYH」であり、F以外は同様に保存されている(図1)。また、該DXEXXXHモチーフのうち、アスパラギン酸及びグルタミン酸を故意に他のアミノ酸に置換した変異体についても本発明の効果は同様に及ぶことは容易に予想することができ、本発明の範疇に入るものであるといえる。

【0012】

本発明の一実施態様としては、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ1 (Exo1) 領域を含有するアミノ酸配列DXEXXXH (D:アスパラギン酸、E:グルタミン酸、H:ヒスチジン、X:任意のアミノ酸) 配列のうち、Hをグルタミン酸やアスパラギン酸などの酸性アミノ酸に置換することにより、改変前の酵素に比べて有意に3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性の低下した耐熱性ポリメラーゼを挙げることができる。

また、本発明の一実施態様としては、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ1 (Exo1) 領域を含有するアミノ酸配列DXEXXXHのうち、Hをアスパラギン酸、グルタミン酸、チロシン、アラニンに置換することにより、核酸増幅能に優れるように改変した耐熱性ポリメラーゼを挙げることができる。

さらに、本発明の一実施態様としては、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を

有するDNAポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ1 (Exo 1) 領域を含有する上記アミノ酸配列DXEXXXHのうち、Hをリジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸に置換することにより、有意に3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性及び／又は正確性を上昇させた耐熱性ポリメラーゼを挙げることができる。

【0013】

本発明の一実施態様としては、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ1 (Exo 1) 領域を含有するDXEXXXH配列のうち、Hを他のアミノ酸に置換した酵素であり、更に下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

DNA合成速度：少なくとも20塩基／秒

熱安定性：pH8.8(25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で10%以上の残存活性を保持することができる

【0014】

また、本発明の別な実施態様としては、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ1 (Exo 1) 領域を含有するDXEXXXH配列のうち、Hを他のアミノ酸に置換した酵素であり、更に下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

DNA合成速度：少なくとも30塩基／秒

熱安定性：pH8.8(25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる

【0015】

また、本発明の別な実施態様としては、下記性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

DNA合成速度：少なくとも30塩基／秒

熱安定性：pH8.8(25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる

至適温度：約75℃

分子量：88～90KDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソ1 (EX01)配列に隣接す

るDXEXXXH配列のうち、少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【0016】

また、本発明の別な実施態様としては、下記性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8(25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソ1(EX01)領域を含有するアミノ酸配列中、第147番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【0017】

本発明の更に具体的な例としては、配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第147番目のヒスチジンをグルタミン酸、アスパラギン酸、チロシン、アラニン、リジン及びアルギニンのいずれかに置換した耐熱性DNAポリメラーゼを挙げることができる。ここで、本願発明において、配列番号2に記載のアミノ酸配列とは、第147番目のヒスチジン残基以外のアミノ酸のうちの1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつDNAポリメラーゼ活性を有するものも含むものである。好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列と95%以上の相同性を有する範囲で、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたものが挙げられる。

【0018】

本発明において、DNA合成活性とは鋳型DNAにアニールされたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの3'-ヒドロキシル基にデオキシヌクレオチド5'-トリホスフェートの α -ホスフェートを共有結合せしめることにより、デオキシリボ核酸にデオキシリボヌクレオチド5'-モノホスフェートを鋳型依存的に導入する反応を触媒する活性をいう。

その活性測定法は、酵素活性が強い場合には、保存緩衝液でサンプルを希釈して測定を行う。本発明では、下記A液25 μ l、B液5 μ l、C液5 μ l、滅菌水

10 μ l、及び酵素溶液 5 μ l をマイクロチューブに加えて 75℃ にて 10 分間反応する。その後氷冷し、E 液 50 μ l、D 液 100 μ l を加えて、攪拌後更に 10 分間氷冷する。この液をガラスフィルター（ワットマン製 GF/C フィルター）で濾過し、D 液及びエタノールで十分洗浄し、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンター（パッカー製）で計測し、鋳型 DNA のヌクレオチドの取り込みを測定する。酵素活性の 1 単位はこの条件で 30 分当りの 10 nmol のヌクレオチドを酸不溶性画分に取り込む酵素量とする。

A : 40 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)

16 mM 塩化マグネシウム

15 mM ジチオスレイトール

100 μ g/ml BSA (牛血清アルブミン)

B : 2 μ g/ μ l 活性化仔牛胸腺 DNA

C : 1.5 mM dNTP (250 cpm/pmol [³H] dTTP)

D : 20% トリクロロ酢酸 (2 mM ピロリン酸ナトリウム)

E : 1 mg/ml サケ精子 DNA

【0019】

本発明において、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性とは DNA の 3' 末端領域を切除し、5' - モノヌクレオチドを遊離する活性をいう。その活性測定は、50 μ l の反応液 (120 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.8, 25℃)、10 mM KCl、6 mM 硫酸アンモニウム、1 mM MgCl₂、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、5 μ g トリチウムラベルされた大腸菌 DNA) を 1.5 ml のマイクロチューブに分注し DNA ポリメラーゼを加える。75℃ で 10 分間反応させた後、氷冷によって反応を停止し、次にキャリアーとして 0.1% の BSA 50 μ l を加え、さらに 10% のトリクロロ酢酸、2% ピロリン酸ナトリウム溶液 100 μ l を加えて混合する。氷上で 15 分放置した後、12000 回転にて 10 分間遠心分離し沈殿を分離する。上清 100 μ l の放射活性を液体シンチレーションカウンター（パッカー製）で計測し、酸可溶性画分に遊離したヌクレオチド量を測定する。

【0020】

本発明において、DNA合成速度とは単位時間あたりのDNA合成数をいう。その測定法はDNAポリメラーゼの反応液(20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5)、8mM 塩化マグネシウム、7.5mM ジチオスレイトール、100μg/ml BSA、0.1mM dNTP、0.2μCi[α-³²P]dCTP)を、プライマーをアニーリングさせたM13mp18 1本鎖DNAと75℃で反応させる。反応停止は等量の反応停止液(50mM 水酸化ナトリウム、10mM EDTA、5%フィコール、0.05%プロモフェノールブルー)を加えることにより行う。上記反応にて合成されたDNAをアルカリアゲロスゲル電気泳動にて分画した後、ゲルを乾燥させオートラジオグラフィーを行う。DNAサイズマーカーとしてはラベルされたλ/HindIIIを用いる。このマーカーのバンドを指標として合成されたDNAのサイズを測定することによってDNA合成速度を求める。

【0021】

本発明において、熱安定性とはポリメラーゼ5単位を100μlの緩衝液(20mM Tris-HCl(pH8.8;25℃での測定値)、10mM 塩化カリウム、10mM 硫酸アンモニウム、2mM 硫酸マグネシウム、0.1% TritonX-100、0.1mg/ml BSA、5mM 2-メルカプトエタノール)に混合し、95℃、6時間の処理での残存活性を意味する。

【0022】

また、本発明において、DNAポリメラーゼの正確性とはDNA複製時における塩基の取り込みの正確性をいう。本発明におけるDNAポリメラーゼの正確性の評価には、ストレプトマイシン耐性に関与するリボゾーマルタンパク質S12(rpsL)遺伝子を指標として行う。ストレプトマイシンは原核細胞のタンパク質合成を阻害する抗生物質であり、細菌の30SリボゾーマルRNA(rRNA)に結合してタンパク質合成の開始複合体形成反応を阻害し、また遺伝子暗号の誤読を引き起こす。ストレプトマイシン耐性変異株ではリボゾームタンパク質S12に変異が見られる。この変異はリボゾームの翻訳忠実度を上げるため、サブレッサー-tRNAによる終始コドンの読み取りを抑制するなど多面的効果(pleiotropic effect)を示すことが知られている。したがって、rpsL遺伝子をPCRにより増幅し菌に形質転換した場合、変異が多く導入されるほどストレプトマイシ

ン耐性菌の出現頻度が増すこととなる。

【 0 0 2 3 】

プラスミド pMol 21 (Journal of Molecular Biology (1999) 289, 835-850 に記載) は、*rpsL* 遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子を含むプラスミドである。このプラスミドのアンピシリン耐性遺伝子上に PCR 増幅用プライマーセット（片方をピオチン化、*MluI* 制限酵素サイトを導入）を設計し、プラスミドの全長を耐熱性 DNA ポリメラーゼにて PCR 増幅し、ストレプトアビジンビーズを用いて精製し、制限酵素 *MluI* を用いて切り出した後、DNA リガーゼを用いて結合して大腸菌を形質転換して、アンピシリンとアンピシリン及びストレプトマイシンを含有する 2 種類のプレートに接種し、それぞれのプレートに出現したコロニーの比を算出することにより遺伝子複製の正確性を求めることができる。

【 0 0 2 4 】

これらの改変された酵素を製造する方法としては、野生型 KOD DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子に変異を導入して、タンパク質工学的手法により新たな機能を有する変異型 KOD DNA ポリメラーゼを製造する方法がある。

変異を導入する DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子は特に限定されないが、例えば、パイロコッカス・コダカラエンシス KOD 1 株由来の配列表・配列番号 3 に記載の遺伝子が挙げられる。

野生型 KOD DNA ポリメラーゼ遺伝子に変異を導入する方法は既知のいかなる方法を用いてもよい。例えば、野生型 KOD DNA ポリメラーゼ遺伝子と変異原となる薬剤を接触させる方法や紫外線照射による方法などからタンパク質工学的手法、例えば PCR や部位特異的変異などの方法を用いることができる。

【 0 0 2 5 】

本発明で使用した QuickChange site-directed mutagenesis キット（ストラタジーン製）は、（１）目的とする遺伝子を挿入したプラスミドを変性させ、該プラスミドに変異プライマーをアニーリングさせ、続いて Pfu DNA ポリメラーゼを用いて伸長反応を行う、（２）（１）のサイクルを 15 回繰り返す、（３）制限酵素 DpnI を用いて鋳型としたプラスミドのみを選択的に切断する、（４）新たに合成されたプラスミドにより大腸菌を形質転換し、目的とする変異の導入され

たプラスミドを保有する形質転換体を取得することのできるキットである。

【0026】

上記改変DNAポリメラーゼ遺伝子を必要に応じて発現ベクターに移し替え、宿主として例えば大腸菌を形質転換した後、アンピシリン等の薬剤を含む寒天培地に塗布し、コロニーを形成させる。コロニーを栄養培地、例えばLB培地や2×YT培地に接種し、37℃で12～20時間培養した後、菌体を破碎して粗酵素液を抽出する。ベクターとしては、pLED-MIもしくはpBluescript由来のものが好ましい。菌体を破碎する方法としては公知のいかなる手法を用いても良いが、例えば超音波処理、フレンチプレスやガラスビーズ破碎のような物理的破碎法やリゾチームのような溶菌酵素を用いることができる。この粗酵素液を80℃、30分間熱処理し、宿主由来のポリメラーゼを失活させ、DNAポリメラーゼ活性を測定する。次に3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を測定し、両者の活性比率を野生型KOD DNAポリメラーゼと比較することにより3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性の変化を測定することができる。

【0027】

上記方法により選抜された菌株から精製DNAポリメラーゼを取得する方法は、いかなる手法を用いても良いが、例えば下記のような方法がある。栄養培地に培養して得られた菌体を回収した後、酵素的または物理的破碎法により破碎抽出して粗酵素液を得る。得られた粗酵素抽出液から熱処理、例えば80℃、30分間処理し、その後硫酸沈殿によりKOD DNAポリメラーゼ画分を回収する。この粗酵素液をセファデックスG-25（アマシャムファルマシア・バイオテック製）を用いたゲル濾過等の方法により脱塩を行うことができる。この操作の後、Qセファロース、ヘパリンセファロースなどのカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。該精製酵素標品はSDS-PAGEによってほぼ単一バンドを示す程度に純化される。

【0028】

また、得られた酵素を用いてPCR増幅を行うことにより、その増幅の有無もしくは強度からPCR効率の評価を行うことができ、また同じくDNA複製の正確性も評価することができる。

【 0 0 2 9 】

また、本発明の核酸増幅方法は、本発明の改変された耐熱性DNAポリメラーゼを使用して、DNAを鋳型とし、プライマー、dNTPを反応させることによりプライマーを伸長して、DNAプライマー伸長物を合成する方法を挙げることができる。プライマーは2種のオリゴヌクレオチドであって、一方は他方のDNA生成物に相補的であるプライマーであることが好ましい。また、加熱および冷却を繰り返すのが好ましい。本発明のDNAポリメラーゼは、その活性を維持するために、例えばマグネシウムイオンのような2価のイオン、及び例えばアンモニウムイオン及び／又はカリウムイオンのような1価のイオンを共存させることが好ましい。また、PCR反応液には、緩衝液及びこれらのイオンを含むと共に、BSA、例えばTriton X-100のような非イオン性界面活性剤、及び緩衝液が存在してもよい。緩衝剤としては、トリスやヘプスなどのグッドバッファーおよび、リン酸緩衝液などが用いられる。

【 0 0 3 0 】

本発明の核酸増幅用試薬は、一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTP、及び上記のような本発明における耐熱性DNAポリメラーゼ、2価イオン、1価イオン、及び緩衝液を含み、さらに具体的には、一方のプライマーが他方のプライマーDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTP及び上記耐熱性DNAポリメラーゼ、マグネシウムイオン、アンモニウムイオン及び／又はカリウムイオン、BSA、上述のような非イオン界面活性剤及び緩衝液を含む。

【 0 0 3 1 】

本発明の核酸増幅用試薬の別な態様としては、一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTP及び上述したような本発明における耐熱性DNAポリメラーゼ、2価イオン、1価イオン、緩衝液、及び必要に応じて耐熱性DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性及び／又は3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を抑制する活性を有する抗体を含む核酸増幅用試薬がある。該抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体などが挙げられる。本核酸増幅用試薬は、PCRの感度上昇、非特異増幅の軽

減に特に有効である。

【0032】

本発明の遺伝子変異導入用試薬は、一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である変異導入プライマー、dNTP、及び上述したような本発明における耐熱性DNAポリメラーゼを含む。さらに上述したような2価イオン、1価イオン、緩衝液を含んでもよい。

【0033】

また、本発明の耐熱性DNAポリメラーゼは、上述したような本発明における耐熱性DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性を化学的もしくは遺伝子工学的な手法を用いて減衰もしくは失活させ、様々な3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するものであってもよい。

【0034】

また、本発明の実施態様としては、上述したような本発明における耐熱性DNAポリメラーゼを1種以上混合したことを特徴とするDNAポリメラーゼ組成物がある。具体的には、上述のような本発明における耐熱性DNAポリメラーゼと別なDNAポリメラーゼ、例えば3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性の低いDNAポリメラーゼなどを混合せしめることによって、長鎖核酸を増幅する場合（例えばlong PCR）に有用な組成物を得ることができる。実際、長鎖核酸を増幅する方法として、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を欠くTaqポリメラーゼと3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するPfuポリメラーゼまたはTiポリメラーゼまたはこれらの変異酵素を混合したDNAポリメラーゼ組成物を用いて、PCRを行う方法が報告されている（Barns, W.M.(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2216-2220）。

【0035】

【実施例】

以下に、実施例を用いて本発明をより具体的に説明する。

【0036】

参考例1 超好熱始原菌KOD1株由来のDNAポリメラーゼ遺伝子のクローニング

鹿児島県子宝島において単離した超好熱始原菌パイロコッカス・コダカラエンス KOD 1 株を 95℃ にて培養後、菌体を回収した。得られた菌体から常法に従って KOD 1 株の染色体 DNA を調製した。パイロコッカス・フリオサス由来の DNA ポリメラーゼ (Pfu DNA ポリメラーゼ) の保存領域アミノ酸配列に基づいて、2 種のプライマー (5'-GGATTAGTATAGTGCCAATGGSSGGCGA-3' 及び 5'-GAGGGCA GAAGTTTATTCCGAGCTT-3') を合成した。この 2 種のプライマーを使用して調製した DNA を鋳型として PCR を行った。

【 0 0 3 7 】

PCR 増幅断片の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を決定した後、この増幅 DNA をプローブとして、KOD 1 株染色体 DNA 制限酵素処理産物に対してサザンハイブリダイゼーションを行い、DNA ポリメラーゼをコードする断片のサイズを求めた (約 4 ~ 7 Kbp)。更に、この大きさの DNA 断片をアガロースゲルから回収し、プラスミド pBluescript (ストラタジーン製) に挿入し、これらの混合物よりエシェリシア・コリ (*Escherichia coli*) JM109 を形質転換してライブラリーを作製した。サザンハイブリダイゼーションに使用したプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行い、上記ライブラリーから KOD 1 株由来の DNA ポリメラーゼ遺伝子を含むと考えられるクローン株 (エシェリシア・コリ JM109/pBSKOD1) を取得した。

取得した上記クローン株よりプラスミド、pBSKOD1 を回収し、定法に従い、塩基配列を決定した。さらに求められた塩基配列からアミノ酸配列を推定した。KOD 1 株由来の DNA ポリメラーゼ遺伝子は 5010 塩基からなり、1670 個のアミノ酸がコードされていた (配列番号 1)。

【 0 0 3 8 】

完全なポリメラーゼ遺伝子を作製するために、2 箇所の介在配列 (1374 ~ 2453 bp 及び 2708 ~ 4316 bp) を PCR 融合法により取り除いた。PCR 融合法では、クローン株より回収したプラスミドを鋳型に 3 組のプライマーを組み合わせ、各々 PCR を行い、介在配列を除いた 3 断片を増幅した。この際、PCR に用いるプライマーは、他の断片と結合する側に結合相手と同様な配列がくるように設計した。また、両端には別々な制限酵素サイト (N 末端側: EcoRV

、C末端側：BamHI）が創出されるように設計した。次いで、PCR増幅断片中構造上中央に位置する断片とN末端側に位置する断片を混合し、PCRを各々の断片をプライマーとして行った。また、同様に構造上中央に位置する断片と、C末端側に位置する断片を混合し、PCRを各々の断片をプライマーとして行った。

このようにして得られた2種の断片を用いて再度PCRを行い、介在配列が取り除かれ、N末端側にEcoRV、C末端側にBamHIサイトを有するKOD1株由来のDNAポリメラーゼをコードする完全な形の遺伝子断片を取得した。更に、同遺伝子をT7プロモーターで誘導可能な発現ベクターpET-8cのNcoI/BamHIサイト、先に創出した制限酵素サイトを利用してサブクローニングを行い、組換え発現ベクター、pET-pol)を得た。なお、エシェリシア・コリ BL21(DE3)/pET-polは生命工学工業研究所へ寄託されている(FERM BP-5513)。

【0039】

実施例1

耐熱性DNAポリメラーゼを改変するために、プラスミドpET-polからKODポリメラーゼ遺伝子を切り出し、pBluescriptにサブクローニングを行った。すなわち、pET-polを制限酵素XbaIとBamHI（東洋紡績製）にて切断し、約2.3 kbのKOD DNAポリメラーゼ遺伝子を切り出した。次にこのDNA断片をライゲーションキット（東洋紡績製 Ligation high）を用いて、XbaIとBamHIで切断したプラスミドpBluescript SK(-)と連結し、コンピテントセル（東洋紡績製 competent high JM109）を形質転換した。100 μ g/mlのアンピシリンを含んだLB寒天培地（1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム、1.5%寒天；ギブコ製）で35℃、16時間培養し、得られたコロニーからプラスミドを調製した。更に、部分塩基配列を確認してKOD DNAポリメラーゼを含むプラスミドpKOD1を得た。

【0040】

実施例2 改変型遺伝子(HE)の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

実施例1で得られたプラスミドpKOD1を用いてKOD DNAポリメラーゼの第

147番目のヒスチジンをグルタミン酸に置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子をもつプラスミドを作製した(pKOD HE)。該プラスミドの作製はQuick Change site directed mutagenesis kit (ストラタジーン製)を用いた。方法は取扱説明書に準じて行った。変異作製用プライマーとしては、配列番号4及び5に記載されるプライマーを使用した。なお、変異体の確認は塩基配列の解読で行った。得られたプラスミドによりエシェリシア・コリJM109を形質転換し、エシェリシア・コリJM109(pKOD HE)を得た。

【0041】

得られた菌体の培養は以下のようにして実施した。まず、滅菌処理した100 μ g/mlのアンピシリンを含有するTB培地(Molecular cloning 2nd edition, p.A.2) 6Lを10Lジャーファーマンターに分注した。この培地に予め100 μ g/mlのアンピシリンを含有する50mlのLB培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム; ギブコ製)で37℃、16時間培養したエシェリシア・コリJM109(pKOD HE) (500ml坂口フラスコ使用)を接種し、35℃にて12時間通気培養した。培養液より菌体を遠心分離により回収し、400mlの破碎緩衝液(10mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)、80mM KCl、5mM 2-メルカプトエタノール、1mM EDTA)に懸濁後、フレンチプレス処理により菌体を破碎し、細胞破碎液を得た。次に細胞破碎液を85℃にて30分間処理した後、遠心分離にて不溶性画分を除去した。更に、ポリエチレンジアミンを用いた除核酸処理、硫酸塩析、ヘパリンセファロースクロマトグラフィーを行い、最後に保存緩衝液(50mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)、50mM 塩化カリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% Tween20、0.1% ノニデットP40、50%グリセリン)に置換し、変異型耐熱性DNAポリメラーゼ(HE)を得た。上記精製工程のDNAポリメラーゼ活性測定は以下の操作で行った。また、酵素活性が高い場合はサンプルを希釈して測定を行った。

【0042】

(試薬)

A: 40mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)

16mM 塩化マグネシウム

15mM ジチオスレイトール

100 μ g/ml BSA

B: 2 μ g/ μ l 活性化仔牛胸腺DNA

C: 1.5mM dNTP (250cpm/pmol [³H] dTTP)

D: 20% トリクロロ酢酸 (2mM ピロリン酸ナトリウム)

E: 1mg/ml サケ精子DNA

【0043】

(方法)

A液 25 μ l、B液 5 μ l、C液 5 μ l 及び滅菌水 10 μ l をマイクロチューブに加えて攪拌混合後、上記精製酵素希釈液 5 μ l を加えて 75℃ で 10 分間反応する。その後冷却し、E液 50 μ l、D液 100 μ l を加えて、攪拌後更に 10 分間氷冷する。この液をガラスフィルター (ワットマン製 GF/C フィルター) で濾過し、D液 及びエタノールで十分洗浄し、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンター (パッカー製) を用いて計測し、鋳型 DNA へのヌクレオチドの取り込みを測定した。酵素活性の 1 単位はこの条件下で 30 分当り 10 nmol のヌクレオチドを酸不溶性画分に取り込む酵素量とした。

【0044】

実施例 3 変異体 (HD) 遺伝子の作製及び改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼの精製

実施例 2 と同様の方法にて、KOD DNA ポリメラーゼの第 147 番目のヒスチジンをアスパラギン酸に置換した耐熱性 DNA ポリメラーゼ遺伝子を作製した (pKOD HD)。変異プライマーとしては、配列番号 6 及び 7 に記載されるプライマーを使用した。更に、実施例 2 と同様の精製方法にて改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ (HD) を得た。

【0045】

実施例 4 変異体 (HY) 遺伝子の作製及び改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼの精製

実施例 2 と同様の方法にて、KOD DNA ポリメラーゼの第 147 番目のヒスチジンをチロシンに置換した耐熱性 DNA ポリメラーゼ遺伝子を作製した (pKOD

D HY)。変異プライマーとしては、配列番号 8 及び 9 に記載されるプライマーを使用した。更に、実施例 2 と同様の精製方法にて改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ(HY)を得た。

【 0 0 4 6 】

実施例 5 変異体(HA)遺伝子の作製及び改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼの精製

実施例 2 と同様の方法にて、KOD DNA ポリメラーゼの第 1 4 7 番目のヒスチジンをアラニンに置換した耐熱性 DNA ポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD HA)。変異プライマーとしては、配列番号 1 0 及び 1 1 に記載されるプライマーを使用した。更に、実施例 2 と同様の精製方法にて改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ(HA)を得た。

【 0 0 4 7 】

実施例 6 変異体(HK)遺伝子の作製及び改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼの精製

実施例 2 と同様の方法にて、KOD DNA ポリメラーゼの第 1 4 7 番目のヒスチジンをリジンに置換した耐熱性 DNA ポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD HK)。変異プライマーとしては、配列番号 1 2 及び 1 3 に記載されるプライマーを使用した。更に、実施例 2 と同様の精製方法にて改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ(HK)を得た。

【 0 0 4 8 】

実施例 7 変異体(HR)遺伝子の作製及び改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼの精製

実施例 2 と同様の方法にて、KOD DNA ポリメラーゼの第 1 4 7 番目のヒスチジンをアルギニンに置換した耐熱性 DNA ポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKOD HR)。変異プライマーとしては、配列番号 1 4 及び 1 5 に記載されるプライマーを使用した。更に、実施例 2 と同様の精製方法にて改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ(HR)を得た。

【 0 0 4 9 】

実施例 8 変異体(HS)遺伝子の作製及び改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼの精

製

実施例 2 と同様の方法にて、KOD DNA ポリメラーゼの第 1 4 7 番目のヒスチジンをセリンに置換した耐熱性 DNA ポリメラーゼ遺伝子を作製した (pKOD HS)。変異プライマーとしては、配列番号 1 6 及び 1 7 に記載されるプライマーを使用した。更に、実施例 2 と同様の精製方法にて改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ (HS) を得た。

【 0 0 5 0 】

実施例 9 変異体 (HQ) 遺伝子の作製及び改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼの精製

実施例 2 と同様の方法にて、KOD DNA ポリメラーゼの第 1 4 7 番目のヒスチジンをグルタミンに置換した耐熱性 DNA ポリメラーゼ遺伝子を作製した (pKOD HQ)。変異プライマーとしては、配列番号 1 8 及び 1 9 に記載されるプライマーを使用した。更に、実施例 2 と同様の精製方法にて改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ (HQ) を得た。

【 0 0 5 1 】

実施例 1 0

上記実施例 2 ～ 1 0 で得られた改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼに加え、IK 及び IQ のエキソヌクレアーゼ活性を以下の方法にて測定した。変異体 IK、IQ は特開平 1 0 - 4 2 8 7 1 号公報に記載される KOD DNA ポリメラーゼの第 1 4 2 番目のイソロイシンをリジンおよびグルタミンに置換した変異体であり、特開平 1 0 - 4 2 8 7 1 号公報に記載の方法に準じて作製した。対照として、野生型 KOD ポリメラーゼ (東洋紡績製) を用いた。5 0 μ l の反応液 (1 2 0 m M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8. 8 、2 5 $^{\circ}$ C)、1 0 m M KCl、6 m M 硫酸アンモニウム、1 m M MgCl₂、0. 1 % Triton X-1 0 0、0. 0 0 1 % BSA、5 μ g トリチウムラベルされた大腸菌 DNA) を 1. 5 ml のマイクロチューブに分注し、DNA ポリメラーゼをそれぞれ 0. 0 6 U、0. 0 2 5 U を加え、7 5 $^{\circ}$ C にて 1 0 分間反応させた。氷冷によって反応を停止し、次にキャリアーとして 0. 1 % の BSA 5 0 μ l を加え、さらに 1 0 % のトリクロロ酢酸、2 % ピロリン酸ナトリウム溶液を 1 0 0 μ l 加えて混合した。その後氷上で 1 5 分放

置した後、12000回転にて10分間遠心分離し沈殿を分離し、上清100 μ lの放射活性を液体シンチレーションカウンター（パッカード社製）で計測し、酸可溶性画分に遊離したヌクレオチド量を測定した。次に、これら2種類の濃度の酵素より得られた、遊離したヌクレオチドのカウントに関するグラフの傾きからそれぞれの酵素の相対エキソヌクレアーゼ活性を算出した。図2に各DNAポリメラーゼの相対エキソヌクレアーゼ活性を示した。

【0052】

本実施例から、本発明によれば、様々な強さのエキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼが得られることが証明された。得られた変異型KODポリメラーゼの3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性は、野生型のKOD DNAポリメラーゼ(100%)に対して、HDは約6.25%、HEは約25%、HYは約90%、HAは約65%、HSは約50%、HQは約50%、HKは約400%、HRは約300%、IKは約6.25%、IQは約25%の活性を有していた。

【0053】

実施例11 改変型DNAポリメラーゼを用いたPCR例(1)

野生型(WT)KODポリメラーゼ、並びに改変型耐熱性DNAポリメラーゼHE、HD、HY、HA、HK、HR、IK及びIQを用いてPCRを行った。変異体IK、IQは、それぞれ特開平10-42871号公報に記載のKOD DNAポリメラーゼにおける第142番目のイソロイシンをリジン及びグルタミンに置換した変異体である。HEとIQ、HDとIKは、それぞれ同程度の3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を示すことが分かっている。PCRは49 μ lの反応液(1 \times KOD-Plus-buffer(東洋紡績製)、1mM MgSO₄、0.2mM dNTP、100ng及び10ngのK562 DNA(ライフテクノロジー社製)、10pmolの配列表20及び21に記載のプライマー)に各酵素(1U/ μ l)を1 μ lを加えてPCRを実施した。サーマルサイクラーはPerkin-Elmer社 PCR system GeneAmp2400を用いて、以下のように行った。すなわち、94℃、2分反応を行った後、94℃、15秒→60℃、30秒→68℃、3分30秒を30サイクル行った。反応終了後10 μ lの反応液についてアガロース電気泳動を行い、エチジウムブロマ

イド染色し、紫外線照射下約3.6kbの増幅DNA断片を確認した。図3にアガロースゲル電気泳動の写真を示した。この結果より、変異体HE、HD、HY、HAを用いた場合、特に低いコピー数の鋳型DNA(10ng)からの増幅において、野生型のKODポリメラーゼを用いるよりも良好な増幅を示すことが証明された。

【0054】

実施例12 改変型DNAポリメラーゼを用いたPCR例(2)

実施例1で良好な結果の得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼHE、HD、HY、HAについて更にサイズの大きな遺伝子の増幅を試みた。49 μ lの反応液(1 \times KOD-Plus- buffer(東洋紡績製)、1mM MgSO₄、0.2mM dNTP、100ng及び50ng K562 DNA(ライフテクノロジー製)、10pmolの配列番号22及び23に記載のプライマー)に各酵素(1U/ μ l)を1 μ l加えてPCRを実施した。サーマルサイクラーはPerkin-Elmer製PCR system GeneAmp2400を用いて以下のように行った。すなわち、94 $^{\circ}$ C、2分反応を行った後、94 $^{\circ}$ C、15秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C、30秒 \rightarrow 68 $^{\circ}$ C、6分を30サイクル行った。反応終了後、10 μ lの反応液についてアガロース電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色して紫外線照射下約6.2kbの増幅断片を確認した。その結果、特にHD及びHEにおいて良好な増幅を確認することができた(図4)。なお、ここには示していないが、野生型(WT)KOD DNAポリメラーゼにおいては増幅は全く確認することができなかった。

【0055】

実施例13 改変型KOD DNAポリメラーゼの正確性の測定

野生型のKOD DNAポリメラーゼ及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼについて正確性を以下の方法にて測定した。49 μ lの反応液(1 \times KOD-Plus-buffer(東洋紡績製)、1mM MgSO₄、0.2mM dNTP、2.5ng プラスミドpMo121(Journal of Molecular Biology(1999)289,835-850)、10pmolの配列番号24及び25に記載のプライマー)に酵素(1U/ μ l)を1 μ l加えてPCRを実施した。ここでは、今回取得した変異体のうちHD、HE、HY、HA、HK、HR、及び特開平10-42871号公報記載のIK、IQを用いて実施した。

サーマルサイクラーはPerkin-Elmer製 PCR system GeneAmp2400を用いて以下のように行った。すなわち、94℃、2分行った後、94℃、15秒→60℃、30秒→68℃、4分を25サイクル行った。また、同時にrTaq DNAポリメラーゼについても増幅反応を実施した。反応条件としては、49 μ lの反応液(1 \times rTaq buffer(東洋紡績製)、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTP、2.5 ng プラスミドpMol 21(Journal of Molecular Biology(1999)289,835-850)、10 pmolの配列番号24及び25に記載のプライマー)に各酵素(5 U/ μ l)を0.5 μ l添加して、94℃、2分反応を行った後、94℃、15秒→60℃、30秒→68℃、5分を25サイクル行った。

【0056】

PCR終了後フェノール/クロロホルム処理し、次いでエタノール沈澱法によりDNAを沈澱させた。沈澱を100 μ lの蒸留水に溶解し、アビジン磁性ビーズ(DYNAL製)を10 μ l添加して30分間転倒混和し、磁性分離用スタンド(Magical Trapper; 東洋紡績製)を用いて磁性ビーズを濃縮した。続いて、磁性ビーズに100 μ lの洗浄液A(10 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0), 1 mM EDTA)、1 M NaCl)を添加して10秒間攪拌し、再び磁性分離用スタンドにて濃縮した(洗浄)。上記洗浄工程をもう一度繰り返した後、洗浄液B(10 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0), 1 mM EDTA))を用いて磁性ビーズを洗浄し、磁性分離用スタンドにて磁性ビーズのみを回収した。次いで、この回収した磁性ビーズに蒸留水40 μ l、制限酵素緩衝液5 μ l及び制限酵素Mlu I(東洋紡績製)50 Uを添加し、37℃にて転倒混和しながら3時間処理した。その後、再び磁性分離用スタンドを用いて磁性ビーズを濃縮し、その上清のみを回収した。回収したDNA溶液をエタノール沈澱法にて脱塩を行い、そのうちの10 ng相当をライゲーション試薬(Ligation high(東洋紡績製)を添加し、16℃で16時間ライゲーション反応を行った。次に、Molecular cloning 2nd edition 1.74~1.81に記載される方法により調製したエシェリシア・コリMF-101株(Journal of Molecular Biology(1999)289,835-850)のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。

【0057】

形質転換を行った大腸菌溶液を2つに分割し、一方を200 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB寒天培地(0.6%)<Aプレート>に、もう片一方を200 μ g/mlのアンピシリンおよび400 μ g/mlのストレプトマイシンを含有するLB寒天培地(0.6%)<Bプレート>で30℃で24時間培養し、出現したコロニー数を計測し、Bプレートに出現したコロニーをAプレートに出現したコロニーで割り、パーセント表示した値を変異率(Mutation frequency)とした。この変異率が低いほど、DNA複製時のDNAポリメラーゼの正確性が良いことを示している。

【0058】

結果を、図5に示した。rTaqは3' - 5' エキソヌクレアーゼ (Proof reading) 活性を有さないため、7.91%という高い変異率を示したのに対し、WT及び今回得られた変異体においては、変異率が全て1%以下であった。また、その中でもWTに対して3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性の高進していたHK、HRにおいてはそれぞれ変異率が0.12%、0.17%とWT0.47%に対して明らかに良好な値を示すことが証明された。

【0059】

【発明の効果】

上述したように、本発明により、様々なDNA増幅効率及び3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性および正確性を有する耐熱性DNAポリメラーゼの作製が可能となった。この方法を用いることにより、従来の始原菌由来の耐熱性DNAポリメラーゼを様々な用途、すなわち長い領域の増幅や、更に正確性の高い増幅など様々な用途に使用できるように、改変された耐熱性DNAポリメラーゼを創出することが可能とするものである。

【0060】

【配列表】

配列番号1

配列の長さ: 5342

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：超好熱始原菌

株名：KOD1

配列の特徴

1 5 6 - 5 1 6 5 P CDS

1 3 7 4 - 2 4 5 3 介在配列

2 7 0 8 - 4 3 1 6 介在配列

配列

GCTTGAGGGC CTGCGGTTAT GGGACGTTGC AGTTTGCGCC TACTCAAAGA TGCCGGTTTT 60
ATAACGGAGA AAAATGGGGA GCTATTACGA TCTCTCCTTG ATGTGGGGTT TACAATAAAG 120
CCTGGATTGT TCTACAAGAT TATGGGGGAT GAAAG ATG ATC CTC GAC ACT GAC 173

Met Ile Leu Asp Thr Asp

1

5

TAC ATA ACC GAG GAT GGA AAG CCT GTC ATA AGA ATT TTC AAG AAG GAA 221
Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile Arg Ile Phe Lys Lys Glu

10

15

20

AAC GGC GAG TTT AAG ATT GAG TAC GAC CGG ACT TTT GAA CCC TAC TTC 269
Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg Thr Phe Glu Pro Tyr Phe

25

30

35

TAC GCC CTC CTG AAG GAC GAT TCT GCC ATT GAG GAA GTC AAG AAG ATA 317
Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile Glu Glu Val Lys Lys Ile

40

45

50

ACC GCC GAG AGG CAC GGG ACG GTT GTA ACG GTT AAG CGG GTT GAA AAG 365
Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr Val Lys Arg Val Glu Lys

55

60

65

70

GTT CAG AAG AAG TTC CTC GGG AGA CCA GTT GAG GTC TGG AAA CTC TAC 413
Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val Glu Val Trp Lys Leu Tyr

75

80

85

| | |
|--|-----|
| TTT ACT CAT CCG CAG GAC GTC CCA GCG ATA AGG GAC AAG ATA CGA GAG | 461 |
| Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala ^a Ile Arg Asp Lys Ile Arg Glu | |
| 90 95 100 | |
| CAT GGG GCA GTT ATT GAC ATC TAC GAG TAC GAC ATA CCC TTC GCC AAG | 509 |
| His Pro Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr Asp Ile Pro Phe Ala Lys | |
| 105 110 115 | |
| CGC TAC CTC ATA GAC AAG GGA TTA GTG CCA ATG GAA GGC GAC GAG GAG | 557 |
| Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro Met Glu Gly Asp Glu Glu | |
| 120 125 130 | |
| CTG AAA ATG CTC GCC TTC GAC ATT GAA ACT CTC TAC CAT GAG GGC GAG | 605 |
| Leu Lys Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr Leu Tyr His Glu Gly Glu | |
| 135 140 145 150 | |
| GAG TTC GCC GAG GGG CCA ATC CTT ATG ATA AGC TAC GCC GAC GAG GAA | 653 |
| Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile Ser Tyr Ala Asp Glu Glu | |
| 155 160 165 | |
| GGG GCC AGG GTG ATA ACT TGG AAG AAC GTG GAT CTC CCC TAC GTT GAC | 701 |
| Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val Asp Leu Pro Tyr Val Asp | |
| 170 175 180 | |
| GTC GTC TCG ACG GAG AGG GAG ATG ATA AAG CGC TTC CTC CGT GTT GTG | 749 |
| Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys Arg Phe Leu Arg Val Val | |
| 185 190 195 | |
| AAG GAG AAA GAC CCG GAC GTT CTC ATA ACC TAC AAC GGC GAC AAC TTC | 797 |
| Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr Tyr Asn Gly Asp Asn Phe | |
| 200 205 210 | |
| GAC TTC GCC TAT CTG AAA AAG CGC TGT GAA AAG CTC GGA ATA AAC TTC | 845 |
| Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu Lys Leu Gly Ile Asn Phe | |
| 215 220 225 230 | |
| GCC CTC GGA AGG GAT GGA AGC GAG CCG AAG ATT CAG AGG ATG GGC GAC | 893 |
| Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys Ile Gln Arg Met Gly Asp | |

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 235 | 240 | 245 | |
| AGG TTT GCC GTC GAA GTG AAG GGA CGG ATA CAC TTC GAT CTC TAT CCT | | | 941 |
| Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile His Phe Asp Leu Tyr Pro | | | |
| 250 | 255 | 260 | |
| GTG ATA AGA CGG ACG ATA AAC CTG CCC ACA TAC ACG CTT GAG GCC GTT | | | 989 |
| Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr Tyr Thr Leu Glu Ala Val | | | |
| 265 | 270 | 275 | |
| TAT GAA GCC GTC TTC GGT CAG CCG AAG GAG AAG GTT TAC GCT GAG GAA | | | 1037 |
| Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu Lys Val Tyr Ala Glu Glu | | | |
| 280 | 285 | 290 | |
| ATA ACC ACA GCC TGG GAA ACC GGC GAG AAC CTT GAG AGA GTC GCC CGC | | | 1085 |
| Ile Thr Thr Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn Leu Glu Arg Val Ala Arg | | | |
| 295 | 300 | 305 | 310 |
| TAC TCG ATG GAA GAT GCG AAG GTC ACA TAC GAG CTT GGG AAG GAG TTC | | | 1133 |
| Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr Glu Leu Gly Lys Glu Phe | | | |
| 315 | 320 | 325 | |
| CTT CCG ATG GAG GCC CAG CTT TCT CGC TTA ATC GGC CAG TCC CTC TGG | | | 1181 |
| Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu Ile Gly Gln Ser Leu Trp | | | |
| 330 | 335 | 340 | |
| GAC GTC TCC CGC TCC AGC ACT GGC AAC CTC GTT GAG TGG TTC CTC CTC | | | 1229 |
| Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu Val Glu Trp Phe Leu Leu | | | |
| 345 | 350 | 355 | |
| AGG AAG GCC TAT GAG AGG AAT GAG CTG GCC CCG AAC AAG CCC GAT GAA | | | 1277 |
| Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala Pro Asn Lys Pro Asp Glu | | | |
| 360 | 365 | 370 | |
| AAG GAG CTG GCC AGA AGA CGG CAG AGC TAT GAA GGA GGC TAT GTA AAA | | | 1325 |
| Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys | | | |
| 375 | 380 | 385 | 390 |
| GAG CCC GAG AGA GGG TTG TGG GAG AAC ATA GTG TAC CTA GAT TTT AGA | | | 1373 |

Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg
 395 400 405
 TGC CAT CCA GCC GAT ACG AAG GTT GTC GTC AAG GGG AAG GGG ATT ATA 1421
 Cys His Pro Ala Asp Thr Lys Val Val Val Lys Gly Lys Gly Ile Ile
 410 415 420
 AAC ATC AGC GAG GTT CAG GAA GGT GAC TAT GTC CTT GGG ATT GAC GGC 1469
 Asn Ile Ser Glu Val Gln Glu Gly Asp Tyr Val Leu Gly Ile Asp Gly
 425 430 435
 TGG CAG AGA GTT AGA AAA GTA TGG GAA TAC GAC TAC AAA GGG GAG CTT 1517
 Trp Gln Arg Val Arg Lys Val Trp Glu Tyr Asp Tyr Lys Gly Glu Leu
 440 445 450
 GTA AAC ATA AAC GGG TTA AAG TGT ACG CCC AAT CAT AAG CTT CCC GTT 1565
 Val Asn Ile Asn Gly Leu Lys Cys Thr Pro Asn His Lys Leu Pro Val
 455 460 465 470
 GTT ACA AAG AAC GAA CGA CAA ACG AGA ATA AGA GAC AGT CTT GCT AAG 1613
 Val Thr Lys Asn Glu Arg Gln Thr Arg Ile Arg Asp Ser Leu Ala Lys
 475 480 485
 TCT TTC CTT ACT AAA AAA GTT AAG GGC AAG ATA ATA ACC ACT CCC CTT 1661
 Ser Phe Leu Thr Lys Lys Val Lys Gly Lys Ile Ile Thr Thr Pro Leu
 490 495 500
 TTC TAT GAA ATA GGC AGA GCG ACA AGT GAG AAT ATT CCA GAA GAA GAG 1709
 Phe Tyr Glu Ile Gly Arg Ala Thr Ser Glu Asn Ile Pro Glu Glu Glu
 505 510 515
 GTT CTC AAG GGA GAG CTC GCT GGC ATA CTA TTG GCT GAA GGA ACG CTC 1757
 Val Leu Lys Gly Glu Leu Ala Gly Ile Leu Leu Ala Glu Gly Thr Leu
 520 525 530
 TTG AGG AAA GAC GTT GAA TAC TTT GAT TCA TCC CGC AAA AAA CGG AGG 1805
 Leu Arg Lys Asp Val Glu Tyr Phe Asp Ser Ser Arg Lys Lys Arg Arg
 535 540 545 550

ATT TCA CAC CAG TAT CGT GTT GAG ATA ACC ATT GGG AAA GAC GAG GAG 1853
Ile Ser His Gln Tyr Arg Val Glu, Ile Thr Ile Gly Lys Asp Glu Glu

555

560

565

GAG TTT AGG GAT CGT ATC ACA TAC ATT TTT GAG CGT TTG TTT GGG ATT 1901
Glu Phe Arg Asp Arg Ile Thr Tyr Ile Phe Glu Arg Leu Phe Gly Ile

570

575

580

ACT CCA AGC ATC TCG GAG AAG AAA GGA ACT AAC GCA GTA ACA CTC AAA 1949
Thr Pro Ser Ile Ser Glu Lys Lys Gly Thr Asn Ala Val Thr Leu Lys

585

590

595

GTT GCG AAG AAG AAT GTT TAT CTT AAA GTC AAG GAA ATT ATG GAC AAC 1997
Val Ala Lys Lys Asn Val Tyr Leu Lys Val Lys Glu Ile Met Asp Asn

600

605

610

ATA GAG TCC CTA CAT GCC CCC TCG GTT CTC AGG GGA TTC TTC GAA GGC 2045
Ile Glu Ser Leu His Ala Pro Ser Val Leu Arg Gly Phe Phe Glu Gly

615

620

625

630

GAC GGT TCA GTA AAC AGG GTT AGG AGG AGT ATT GTT GCA ACC CAG GGT 2093
Asp Gly Ser Val Asn Arg Val Arg Arg Ser Ile Val Ala Thr Gln Gly

635

640

645

ACA AAG AAC GAG TGG AAG ATT AAA CTG GTG TCA AAA CTG CTC TCC CAG 2141
Thr Lys Asn Glu Trp Lys Ile Lys Leu Val Ser Lys Leu Leu Ser Gln

650

655

660

CTT GGT ATC CCT CAT CAA ACG TAC ACG TAT CAG TAT CAG GAA AAT GGG 2189
Leu Gly Ile Pro His Gln Thr Tyr Thr Tyr Gln Tyr Gln Glu Asn Gly

665

670

675

AAA GAT CGG AGC AGG TAT ATA CTG GAG ATA ACT GGA AAG GAC GGA TTG 2237
Lys Asp Arg Ser Arg Tyr Ile Leu Glu Ile Thr Gly Lys Asp Gly Leu

680

685

690

ATA CTG TTC CAA ACA CTC ATT GGA TTC ATC AGT GAA AGA AAG AAC GCT 2285
Ile Leu Phe Gln Thr Leu Ile Gly Phe Ile Ser Glu Arg Lys Asn Ala

| | | | |
|--|-----|-----|-----|
| 695 | 700 | 705 | 710 |
| CTG CTT AAT AAG GCA ATA TCT CAG AGG GAA ATG AAC AAC TTG GAA AAC 2333 | | | |
| Leu Leu Asn Lys Ala Ile Ser Gln Arg Glu Met Asn Asn Leu Glu Asn | | | |
| 715 | 720 | 725 | |
| AAT GGA TTT TAC AGG CTC AGT GAA TTC AAT GTC AGC ACG GAA TAC TAT 2381 | | | |
| Asn Gly Phe Tyr Arg Leu Ser Glu Phe Asn Val Ser Thr Glu Tyr Tyr | | | |
| 730 | 735 | 740 | |
| GAG GGC AAG GTC TAT GAC TTA ACT CTT GAA GGA ACT CCC TAC TAC TTT 2429 | | | |
| Glu Gly Lys Val Tyr Asp Leu Thr Leu Glu Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe | | | |
| 745 | 750 | 755 | |
| GCC AAT GGC ATA TTG ACC CAT AAC TCC CTG TAC CCC TCA ATC ATC ATC 2477 | | | |
| Ala Asn Gly Ile Leu Thr His Asn Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile | | | |
| 760 | 765 | 770 | |
| ACC CAC AAC GTC TCG CCG GAT ACG CTC AAC AGA GAA GGA TGC AAG GAA 2525 | | | |
| Thr His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu | | | |
| 775 | 780 | 785 | 790 |
| TAT GAC GTT GCC CCA CAG GTC GGC CAC CGC TTC TGC AAG GAC TTC CCA 2573 | | | |
| Tyr Asp Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro | | | |
| 795 | 800 | 805 | |
| GGA TTT ATC CCG AGC CTG CTT GGA GAC CTC CTA GAG GAG AGG CAG AAG 2621 | | | |
| Gly Phe Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys | | | |
| 810 | 815 | 820 | |
| ATA AAG AAG AAG ATG AAG GCC ACG ATT GAC CCG ATC GAG AGG AAG CTC 2669 | | | |
| Ile Lys Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu | | | |
| 825 | 830 | 835 | |
| CTC GAT TAC AGG CAG AGG GCC ATC AAG ATC CTG GCA AAC AGC ATC CTA 2717 | | | |
| Leu Asp Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Ile Leu | | | |
| 840 | 845 | 850 | |
| CCC GAG GAA TGG CTT CCA GTC CTC GAG GAA GGG GAG GTT CAC TTC GTC 2765 | | | |

Pro Glu Glu Trp Leu Pro Val Leu Glu Glu Gly Glu Val His Phe Val
855 860 865 870
AGG ATT GGA GAG CTC ATA GAC CGG ATG ATG GAG GAA AAT GCT GGG AAA 2813
Arg Ile Gly Glu Leu Ile Asp Arg Met Met Glu Glu Asn Ala Gly Lys
875 880 885
GTA AAG AGA GAG GGC GAG ACG GAA GTG CTT GAG GTC AGT GGG CTT GAA 2861
Val Lys Arg Glu Gly Glu Thr Glu Val Leu Glu Val Ser Gly Leu Glu
890 895 900
GTC CCG TCC TTT AAC AGG AGA ACT AAC AAG GCC GAG CTC AAG AGA GTA 2909
Val Pro Ser Phe Asn Arg Arg Thr Asn Lys Ala Glu Leu Lys Arg Val
905 910 915
AAG GCC CTG ATT AGG CAC GAT TAT TCT GGC AAG GTC TAC ACC ATC AGA 2957
Lys Ala Leu Ile Arg His Asp Tyr Ser Gly Lys Val Tyr Thr Ile Arg
920 925 930
CTG AAG TCG GGG AGG AGA ATA AAG ATA ACC TCT GGC CAC AGC CTC TTC 3005
Leu Lys Ser Gly Arg Arg Ile Lys Ile Thr Ser Gly His Ser Leu Phe
935 940 945 950
TCT GTG AGA AAC GGG GAG CTC GTT GAA GTT ACG GGC GAT GAA CTA AAG 3053
Ser Val Arg Asn Gly Glu Leu Val Glu Val Thr Gly Asp Glu Leu Lys
955 960 965
CCA GGT GAC CTC GTT GCA GTC CCG CGG AGA TTG GAG CTT CCT GAG AGA 3101
Pro Gly Asp Leu Val Ala Val Pro Arg Arg Leu Glu Leu Pro Glu Arg
970 975 980
AAC CAC GTG CTG AAC CTC GTT GAA CTG CTC CTT GGA ACG CCA GAA GAA 3149
Asn His Val Leu Asn Leu Val Glu Leu Leu Leu Gly Thr Pro Glu Glu
985 990 995
GAA ACT TTG GAC ATC GTC ATG ACG ATC CCA GTC AAG GGT AAG AAG AAC 3197
Glu Thr Leu Asp Ile Val Met Thr Ile Pro Val Lys Gly Lys Lys Asn
1000 1005 1010

TTC TTT AAA GGG ATG CTC AGG ACT TTG CGC TGG ATT TTC GGA GAG GAA 3245
Phe Phe Lys Gly Met Leu Arg Thr, Leu Arg Trp Ile Phe Gly Glu Glu

1015 1020 1025 1030
AAG AGG CCC AGA ACC GCG AGA CGC TAT CTC AGG CAC CTT GAG GAT CTG 3293
Lys Arg Pro Arg Thr Ala Arg Arg Tyr Leu Arg His Leu Glu Asp Leu

 1035 1040 1045
GGC TAT GTC CGG CTT AAG AAG ATC GGC TAC GAA GTC CTC GAC TGG GAC 3341
Gly Tyr Val Arg Leu Lys Lys Ile Gly Tyr Glu Val Leu Asp Trp Asp

 1050 1055 1060
TCA CTT AAG AAC TAC AGA AGG CTC TAC GAG GCG CTT GTC GAG AAC GTC 3389
Ser Leu Lys Asn Tyr Arg Arg Leu Tyr Glu Ala Leu Val Glu Asn Val

 1065 1070 1075
AGA TAC AAC GGC AAC AAG AGG GAG TAC CTC GTT GAA TTC AAT TCC ATC 3437
Arg Tyr Asn Gly Asn Lys Arg Glu Tyr Leu Val Glu Phe Asn Ser Ile

 1080 1085 1090
CGG GAT GCA GTT GGC ATA ATG CCC CTA AAA GAG CTG AAG GAG TGG AAG 3485
Arg Asp Ala Val Gly Ile Met Pro Leu Lys Glu Leu Lys Glu Trp Lys

1095 1100 1105 1110
ATC GGC ACG CTG AAC GGC TTC AGA ATG AGA AAG CTC ATT GAA GTG GAC 3533
Ile Gly Thr Leu Asn Gly Phe Arg Met Arg Lys Leu Ile Glu Val Asp

 1115 1120 1125
GAG TCG TTA GCA AAG CTC CTC GGC TAC TAC GTG AGC GAG GGC TAT GCA 3581
Glu Ser Leu Ala Lys Leu Leu Gly Tyr Tyr Val Ser Glu Gly Tyr Ala

 1130 1135 1140
AGA AAG CAG AGG AAT CCC AAA AAC GGC TGG AGC TAC AGC GTG AAG CTC 3629
Arg Lys Gln Arg Asn Pro Lys Asn Gly Trp Ser Tyr Ser Val Lys Leu

 1145 1150 1155
TAC AAC GAA GAC CCT GAA GTG CTG GAC GAT ATG GAG AGA CTC GCC AGC 3677
Tyr Asn Glu Asp Pro Glu Val Leu Asp Asp Met Glu Arg Leu Ala Ser

| | | | |
|--|------|------|------|
| 1160 | 1165 | 1170 | |
| AGG TTT TTC GGG AAG GTG AGG CGG GGC AGG AAC TAC GTT GAG ATA CCG 3725 | | | |
| Arg Phe Phe Gly Lys Val Arg Arg Gly Arg Asn Tyr Val Glu Ile Pro | | | |
| 1175 | 1180 | 1185 | 1190 |
| AAG AAG ATC GGC TAC CTG CTC TTT GAG AAC ATG TGC GGT GTC CTA GCG 3773 | | | |
| Lys Lys Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Glu Asn Met Cys Gly Val Leu Ala | | | |
| | 1195 | 1200 | 1205 |
| GAG AAC AAG AGG ATT CCC GAG TTC GTC TTC ACG TCC CCG AAA GGG GTT 3821 | | | |
| Glu Asn Lys Arg Ile Pro Glu Phe Val Phe Thr Ser Pro Lys Gly Val | | | |
| | 1210 | 1215 | 1220 |
| CGG CTG GCC TTC CTT GAG GGG TAC TCA TCG GCG ATG GCG ACG TCC ACC 3869 | | | |
| Arg Leu Ala Phe Leu Glu Gly Tyr Ser Ser Ala Met Ala Thr Ser Thr | | | |
| | 1225 | 1230 | 1235 |
| GAA CAA GAG ACT CAG GCT CTC AAC GAA AAG CGA GCT TTA GCG AAC CAG 3917 | | | |
| Glu Gln Glu Thr Gln Ala Leu Asn Glu Lys Arg Ala Leu Ala Asn Gln | | | |
| | 1240 | 1245 | 1250 |
| CTC GTC CTC CTC TTG AAC TCG GTG GGG GTC TCT GCT GTA AAA CTT GGG 3965 | | | |
| Leu Val Leu Leu Leu Asn Ser Val Gly Val Ser Ala Val Lys Leu Gly | | | |
| 1255 | 1260 | 1265 | 1270 |
| CAC GAC AGC GGC GTT TAC AGG GTC TAT ATA AAC GAG GAG CTC CCG TTC 4013 | | | |
| His Asp Ser Gly Val Tyr Arg Val Tyr Ile Asn Glu Glu Leu Pro Phe | | | |
| | 1275 | 1280 | 1285 |
| GTA AAG CTG GAC AAG AAA AAG AAC GCC TAC TAC TCA CAC GTG ATC CCC 4061 | | | |
| Val Lys Leu Asp Lys Lys Lys Asn Ala Tyr Tyr Ser His Val Ile Pro | | | |
| | 1290 | 1295 | 1300 |
| AAG GAA GTC CTG AGC GAG GTC TTT GGG AAG GTT TTC CAG AAA AAC GTC 4109 | | | |
| Lys Glu Val Leu Ser Glu Val Phe Gly Lys Val Phe Gln Lys Asn Val | | | |
| | 1305 | 1310 | 1315 |
| AGT CCT CAG ACC TTC AGG AAG ATG GTC GAG GAC GGA AGA CTC GAT CCC 4157 | | | |

Ser Pro Gln Thr Phe Arg Lys Met Val Glu Asp Gly Arg Leu Asp Pro

1320

1325

1330

GAA AAG GCC CAG AGG CTC TCC TGG CTC ATT GAG GGG GAC GTA GTG CTC 4205

Glu Lys Ala Gln Arg Leu Ser Trp Leu Ile Glu Gly Asp Val Val Leu

1335

1340

1345

1350

GAC CGC GTT GAG TCC GTT GAT GTG GAA GAC TAC GAT GGT TAT GTC TAT 4253

Asp Arg Val Glu Ser Val Asp Val Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Val Tyr

1355

1360

1365

GAC CTG AGC GTC GAG GAC AAC GAG AAC TTC CTC GTT GGC TTT GGG TTG 4301

Asp Leu Ser Val Glu Asp Asn Glu Asn Phe Leu Val Gly Phe Gly Leu

1370

1375

1380

GTC TAT GCT CAC AAC AGC TAC TAC GGT TAC TAC GGC TAT GCA AGG GCG 4349

Val Tyr Ala His Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala

1385

1390

1395

CGC TGG TAC TGC AAG GAG TGT GCA GAG AGC GTA ACG GCC TGG GGA AGG 4397

Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg

1400

1405

1410

GAG TAC ATA ACG ATG ACC ATC AAG GAG ATA GAG GAA AAG TAC GGC TTT 4445

Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile Glu Glu Lys Tyr Gly Phe

1415

1420

1425

1430

AAG GTA ATC TAC AGC GAC ACC GAC GGA TTT TTT GCC ACA ATA CCT GGA 4493

Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe Phe Ala Thr Ile Pro Gly

1435

1440

1445

GCC GAT GCT GAA ACC GTC AAA AAG AAG GCT ATG GAG TTC CTC AAG TAT 4541

Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala Met Glu Phe Leu Lys Tyr

1450

1455

1460

ATC AAC GCC AAA CTT CCG GGC GCG CTT GAG CTC GAG TAC GAG GGC TTC 4589

Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe

1465

1470

1475

TAC AAA CGC GGC TTC TTC GTC ACG AAG AAG AAG TAT GCG GTG ATA GAC 4637
Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys Lys Tyr Ala Val Ile Asp
1480 1485 1490
GAG GAA GGC AAG ATA ACA ACG CGC GGA CTT GAG ATT GTG AGG CGT GAC 4685
Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp
1495 1500 1505 1510
TGG AGC GAG ATA GCG AAA GAG ACG CAG GCG AGG GTT CTT GAA GCT TTG 4733
Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala Arg Val Leu Glu Ala Leu
1515 1520 1525
CTA AAG GAC GGT GAC GTC GAG AAG GCC GTG AGG ATA GTC AAA GAA GTT 4781
Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val Arg Ile Val Lys Glu Val
1530 1535 1540
ACC GAA AAG CTG AGC AAG TAC GAG GTT CCG CCG GAG AAG CTG GTG ATC 4829
Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro Pro Glu Lys Leu Val Ile
1545 1550 1555
CAC GAG CAG ATA ACG AGG GAT TTA AAG GAC TAC AAG GCA ACC GGT CCC 4877
His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Lys Ala Thr Gly Pro
1560 1565 1570
CAC GTT GCC GTT GCC AAG AGG TTG GCC GCG AGA GGA GTC AAA ATA CGC 4925
His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala Arg Gly Val Lys Ile Arg
1575 1580 1585 1590
CCT GGA ACG GTG ATA AGC TAC ATC GTG CTC AAG GGC TCT GGG AGG ATA 4973
Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu Lys Gly Ser Gly Arg Ile
1595 1600 1605
GGC GAC AGG GCG ATA CCG TTC GAC GAG TTC GAC CCG ACG AAG CAC AAG 5021
Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe Asp Pro Thr Lys His Lys
1610 1615 1620
TAC GAC GCC GAG TAC TAC ATT GAG AAC CAG GTT CTC CCA GCC GTT GAG 5069
Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Val Leu Pro Ala Val Glu

| | | | |
|---|------|------|------|
| 1625 | 1630 | 1635 | |
| AGA ATT CTG AGA GCC TTC GGT TAC CGC AAG GAA GAC CTG CGC TAC CAG 5117 | | | |
| Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln | | | |
| 1640 | 1645 | 1650 | |
| AAG ACG AGA CAG GTT GGT TTG AGT GCT TGG CTG AAG CCG AAG GGA ACT 5165 | | | |
| Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp Leu Lys Pro Lys Gly Thr | | | |
| 1655 | 1660 | 1665 | 1670 |
| TGACCTTTCC ATTTGTTTTT CAGCGGATAA CCCTTTAACT TCCCTTTCAA AAACCTCCCTT 5225 | | | |
| TAGGGAAAAGA CCATGAAGAT AGAAATCCGG CGGCGCCCGG TTAAATACGC TAGGATAGAA 5285 | | | |
| GTGAAGCCAG ACGGCAGGGT AGTCGTCAC TCCCCGAGGG TTCAACGTTG AGAAGTT 5342 | | | |

【 0 0 6 1 】

配列番号 2

配列の長さ : 7 7 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質

配列

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ile | Leu | Asp | Thr | Asp | Tyr | Ile | Thr | Glu | Asp | Gly | Lys | Pro | Val | Ile |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Arg | Ile | Phe | Lys | Lys | Glu | Asn | Gly | Glu | Phe | Lys | Ile | Glu | Tyr | Asp | Arg |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Thr | Phe | Glu | Pro | Tyr | Phe | Tyr | Ala | Leu | Leu | Lys | Asp | Asp | Ser | Ala | Ile |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | |
| Glu | Glu | Val | Lys | Lys | Ile | Thr | Ala | Glu | Arg | His | Gly | Thr | Val | Val | Thr |
| | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | |
| Val | Lys | Arg | Val | Glu | Lys | Val | Gln | Lys | Lys | Phe | Leu | Gly | Arg | Pro | Val |
| | | | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | 80 |
| Glu | Val | Trp | Lys | Leu | Tyr | Phe | Thr | His | Pro | Gln | Asp | Val | Pro | Ala | Ile |
| | | | | | | | | | 85 | | | | 90 | | 95 |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| Arg Asp Lys Ile Arg Glu His Pro Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Arg Phe Leu Arg Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Lys Leu Gly Ile Asn Phe Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Thr Thr Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu | | | |

| | | | |
|---|---------------------------------|-----|-----|
| | 325 | 330 | 335 |
| Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val. | Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| Pro Asn Lys Pro Asp Glu Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys | | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu Leu Asp | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser | | | |
| 500 | 505 | 510 | |
| Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile | | | |
| 515 | 520 | 525 | |
| Glu Glu Lys Tyr Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe | | | |
| 530 | 535 | 540 | |
| Phe Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala | | | |
| 545 | 550 | 555 | 560 |

Met Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu
565 570 575

Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
580 585 590

Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
595 600 605

Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
610 615 620

Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val
625 630 635 640

Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
645 650 655

Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp
660 665 670

Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
675 680 685

Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
690 695 700

Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
705 710 715 720

Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
725 730 735

Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
740 745 750

Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp
755 760 765

Leu Lys Pr Lys Gly Thr
770

【 0 0 6 2 】

配列番号3

配列の長さ：2325

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列

```
ATGATCCTCG AACTGACTA CATAACCGAG GATGGAAAGC CTGTCATAAG AATTTTCAAG 60
AAGGAAAACG GCGAGTTTAA GATTGAGTAC GACCGGACTT TTGAACCCTA CTTCTACGCC 120
CTCCTGAAGG ACGATTCTGC CATTGAGGAA GTCAAGAAGA TAACCGCCGA GAGGCACGGG 180
ACGGTTGTAA CGGTAAAGCG GGTGAAAAG GTTCAGAAGA AGTTCCTCGG GAGACCAGTT 240
GAGGTCTGGA AACTCTACTT TACTCATCCG CAGGACGTCC CAGCGATAAG GGACAAGATA 300
CGAGAGCATC CAGCAGTTAT TGACATCTAC GAGTACGACA TACCCTTCGC CAAGCGCTAC 360
CTCATAGACA AGGGATTAGT GCCAATGGAA GGCGACGAGG AGCTGAAAAT GCTCGCCTTC 420
GACATTGAAA CTCTCTACCA TGAGGGCGAG GAGTTCGCCG AGGGGCCAAT CCTTATGATA 480
AGCTACGCCG ACGAGGAAGG GGCCAGGGTG ATAAC TTGGA AGAACGTGGA TCTCCCCTAC 540
GTTGACGTCG TCTCGACGGA GAGGGAGATG ATAAAGCGCT TCCTCCGTGT TGTGAAGGAG 600
AAAGACCCGG ACGTTCTCAT AACCTACAAC GGCGACAAC TCGACTTCGC CTATCTGAAA 660
AAGCGCTGTG AAAAGCTCGG AATAAACTTC GCCCTCGGAA GGGATGGAAG CGAGCCGAAG 720
ATTCAGAGGA TGGGCGACAG GTTTGCCGTC GAAGTGAAGG GACGGATACA CTTGATCTC 780
TATCCTGTGA TAAGACGGAC GATAAACCTG CCCACATACA CGCTTGAGGC CGTTTATGAA 840
GCCGTCTTCG GTCAGCCGAA GGAGAAGGTT TACGCTGAGG AAATAACCAC AGCCTGGGAA 900
ACCGGCGAGA ACCTTGAGAG AGTCGCCCGC TACTCGATGG AAGATGCGAA GGTCACATAC 960
GAGCTTGGGA AGGAGTTCCT TCCGATGGAG GCCCAGCTTT CTCGCTTAAT CGGCCAGTCC 1020
CTCTGGGACG TCTCCCGCTC CAGCACTGGC AACCTCGTTG AGTGTTTCCT CCTCAGGAAG 1080
GCCTATGAGA GGAATGAGCT GGCCCCGAAC AAGCCCGATG AAAAGGAGCT GGCCAGAAGA 1140
CGGCAGAGCT ATGAAGGAGG CTATGTAAAA GAGCCCGAGA GAGGGTTGTG GGAGAACATA 1200
GTGTACCTAG ATTTTAGATC CCTGTACCCC TCAATCATCA TCACCCACAA CGTCTCGCCG 1260
GATACGCTCA ACAGAGAAGG ATGCAAGGAA TATGACGTTG CCCCACAGGT CGGCCACCGC 1320
```

TTCTGCAAGG ACTTCCCAGG ATTTATCCCG AGCCTGCTTG GAGACCTCCT AGAGGAGAGG 1380
 CAGAAGATAA AGAAGAAGAT GAAGGCCACG ATTGACCCGA TCGAGAGGAA GCTCCTCGAT 1440
 TACAGGCAGA GGGCCATCAA GATCCTGGCA AACAGCTACT ACGGTTACTA CGGCTATGCA 1500
 AGGGCGCGCT GGTACTGCAA GGAGTGTGCA GAGAGCGTAA CGGCCTGGGG AAGGGAGTAC 1560
 ATAACGATGA CCATCAAGGA GATAGAGGAA AAGTACGGCT TTAAGGTAAT CTACAGCGAC 1620
 ACCGACGGAT TTTTGGCCAC AATACCTGGA GCCGATGCTG AAACCGTCAA AAAGAAGGCT 1680
 ATGGAGTTCC TCAAGTATAT CAACGCCAAA CTTCCGGGCG CGCTTGAGCT CGAGTACGAG 1740
 GGCTTCTACA AACGCGGCTT CTCGTCACG AAGAAGAAAGT ATGCGGTGAT AGACGAGGAA 1800
 GGCAAGATAA CAACGCGCGG ACTTGAGATT GTGAGGCGTG ACTGGAGCGA GATAGCGAAA 1860
 GAGACGCAGG CGAGGGTTCT TGAAGCTTTG CTAAAGGACG GTGACGTCGA GAAGGCCGTG 1920
 AGGATAGTCA AAGAAGTTAC CGAAAAGCTG AGCAAGTACG AGGTTCCGCC GGAGAAGCTG 1980
 GTGATCCACG AGCAGATAAC GAGGGATTTA AAGGACTACA AGGCAACCGG TCCCCACGTT 2040
 GCCGTTGCCA AGAGGTTGGC CGCGAGAGGA GTCAAAATAC GCCCTGGAAC GGTGATAAGC 2100
 TACATCGTGC TCAAGGGCTC TGGGAGGATA GGCGACAGGG CGATACCGTT CGACGAGTTC 2160
 GACCCGACGA AGCACAAAGTA CGACGCCGAG TACTACATTG AGAACCAGGT TCTCCCAGCC 2220
 GTTGAGAGAA TTCTGAGAGC CTTGCGTTAC CGCAAGGAAG ACCTGCGCTA CCAGAAGACG 2280
 AGACAGGTTG GTTTGAGTGC TTGGCTGAAG CCGAAGGGAA CTTGA 2325

【 0 0 6 3 】

配列番号4

配列の長さ : 34

配列の型 : 核酸 (DNA)

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GAAACTCTCT ACGAGGAGGG CGAGGAGTTC GCCG

34

【 0 0 6 4 】

配列番号5

配列の長さ : 34

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CGGCGAACTC CTCGCCCTCC TCGTAGAGAG TTTC

34

【0065】

配列番号6

配列の長さ：34

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GAAACTCTCT ACGACGAGGG CGAGGAGTTC GCCG

34

【0066】

配列番号7

配列の長さ：34

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CGGCGAACTC CTCGCCCTCG TCGTAGAGAG TTTC

34

【0067】

配列番号8

配列の長さ：34

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GAAACTCTCT ACTACGAGGG CGAGGAGTTC GCCG

34

【0068】

配列番号9

配列の長さ：34

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CGGCGAACTC CTCGCCCTCG TAGTAGAGAG TTTC

34

【0069】

配列番号10

配列の長さ：32

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GAAACTCTCT ACGCCGAGGG CGAGGAGTTC GC

32

【0070】

配列番号11

配列の長さ：32

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GCGAACTCCT CGCCCTCGGC GTAGAGAGTT TC

32

【 0 0 7 1 】

配列番号12

配列の長さ：30

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GAAACTCTCT ACAAGGAGGG CGAGGAGTTC

30

【 0 0 7 2 】

配列番号13

配列の長さ：30

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GAACTCCTCG CCCTCCTTGT AGAGAGTTTC

30

【 0 0 7 3 】

配列番号14

配列の長さ：32

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AAAGCTCTCT ACAGGGAGGG CGAGGAGTTC GC

32

【 0 0 7 4 】

配列番号15

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸 (DNA)

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GCGAACTCCT CGCCCTCCCT GTAGAGAGTT TC

32

【 0 0 7 5 】

配列番号16

配列の長さ : 34

配列の型 : 核酸 (DNA)

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

GAAACTCTCT ACTCTGAGGG CGAGGAGTTC GCCG

34

【 0 0 7 6 】

配列番号17

配列の長さ : 34

配列の型 : 核酸 (DNA)

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA

配列

CGGCGAACTC CTCGCCCTCA GAGTAGAGAG TTTC

34

【 0 0 7 7 】

配列番号18

配列の長さ：34

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GAAACTCTCT ACCAGGAGGG CGAGGAGTTC GCCG

34

【0078】

配列番号19

配列の長さ：34

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CGGCGAACTC CTCGCCCTCC TGGTAGAGAG TTTC

34

【0079】

配列番号20

配列の長さ：22

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGTGTTCCCT TGATGTAGCA CA

22

【0080】

配列番号21

配列の長さ：26

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACATGTATTT GCATGGAAAA CAACTC

26

【0081】

配列番号22

配列の長さ：20

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AGTGCTTCGT GCCCGATGAC

20

【0082】

配列番号23

配列の長さ：21

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TGCCCCTTGG TGACATACTC G

21

【0083】

配列番号24

配列の長さ：

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（5'ビオチン化）

配列

AAAAACGCGT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTAC

35

【0084】

配列番号25

配列の長さ：

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AAAAACGCGT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGT

34

【図面の簡単な説明】

【図1】

様々なDNAポリメラーゼのエキソ1領域（下線）及びそれに隣接するアミノ酸配列を示す図である。

【図2】

各KOD DNAポリメラーゼ変異体の相対3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を示す図（WTの活性を100とした）である。

【図3】

各KOD DNAポリメラーゼ変異体のヒトゲノムDNAを鋳型とした β -globin遺伝子（3.6 kb）のPCRによる増幅を示す図である。

A：100 ngのヒト細胞株K562由来DNAを反応に使用

B：10 ngのヒト細胞株K562由来DNAを反応に使用

1：WT 2：HD 3：HE 4：HY 5：HA 6：HK 7：HR 8：IK 9：I

Q

【図4】

各KOD DNAポリメラーゼ変異体のヒトゲノムDNAを鋳型としたMyosin

heavy chain遺伝子(6. 2 kb) のPCRによる増幅を示す図である。

5 0 ngのヒト細胞株K 5 6 2 より抽出したDNAを使用

1 : HD、2 : HE、3 : HY、4 : HA

【図 5】

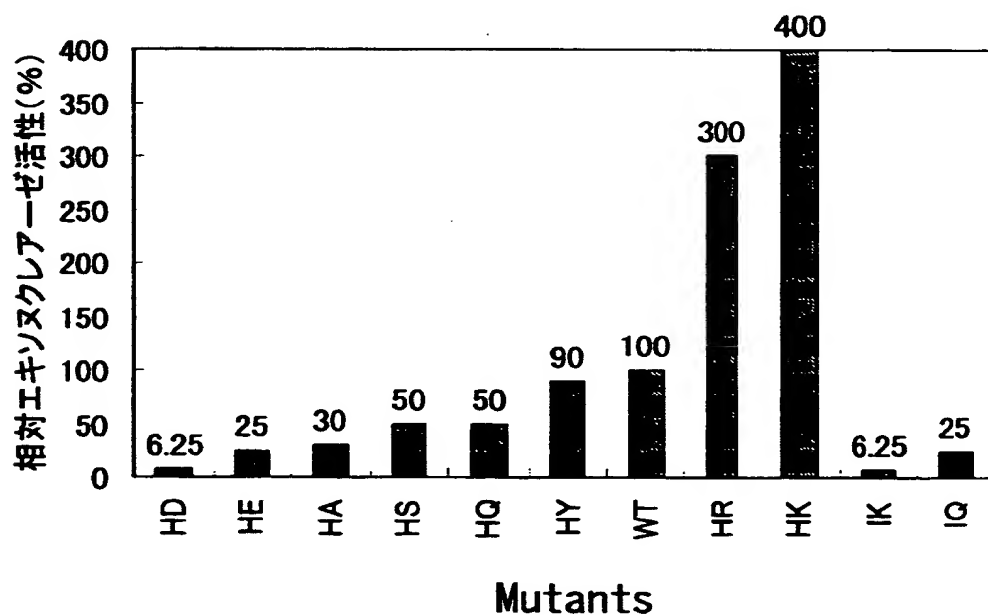
各KOD DNAポリメラーゼ変異体のPCR増幅における変異率 (Mutation frequency) を示す図である。

【書類名】 図面

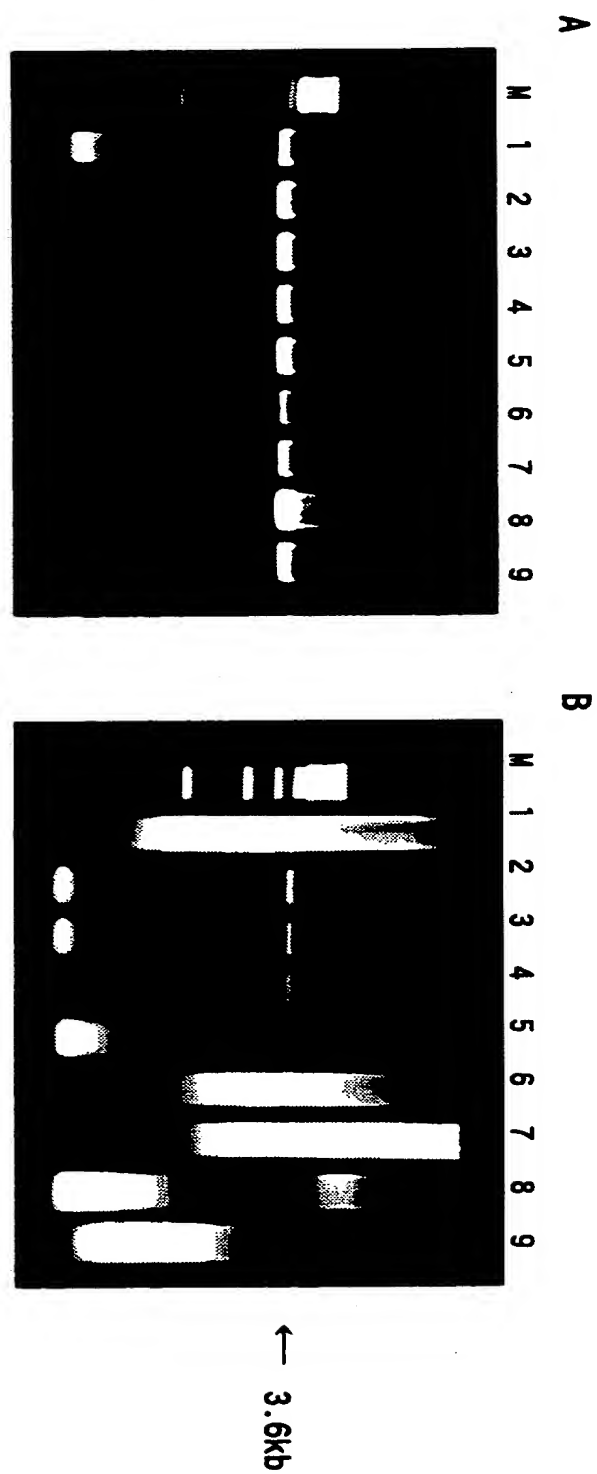
【図 1】

| | | |
|--------|--------------------|------------------------|
| 始原菌由来 | KOD(Pyrococcus) | : <u>MLAFDIETLYHEG</u> |
| | Pfu(Pyrococcus) | : <u>ILAFDIETLYHEG</u> |
| | Vent(Thermococcus) | : <u>LLAFDIETFYHEG</u> |
| | Sso(Sulfolobus) | : <u>RVAIDIEVYTPVK</u> |
| ファージ由来 | T7 | : <u>MIVSDIEANALLE</u> |
| | T4 | : <u>VANCDIEVTGDKF</u> |

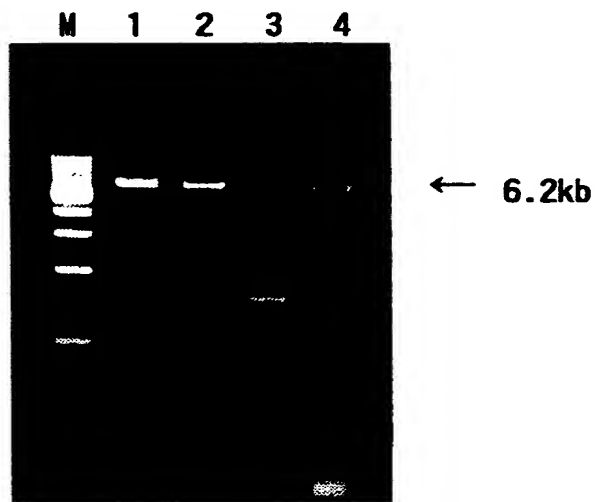
【図 2】



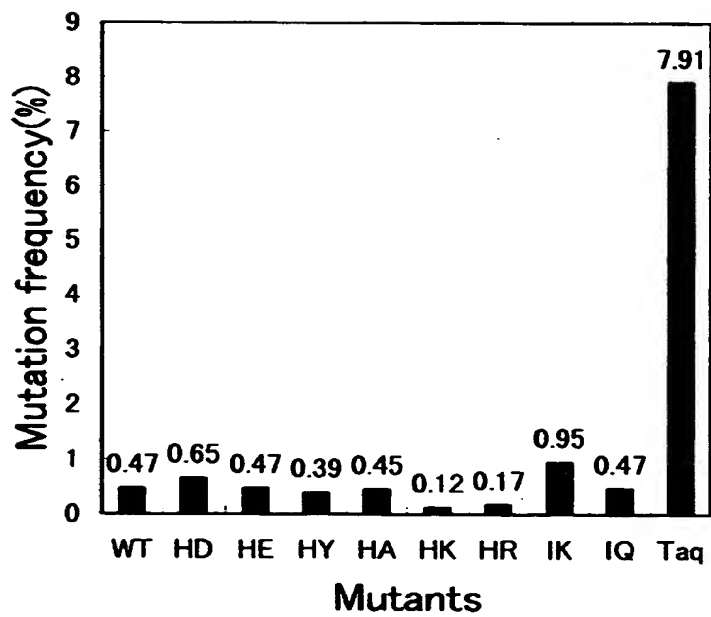
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遺伝子の増幅効率及び増幅の正確性の点で優れたPCRを可能とする耐熱性DNAポリメラーゼを提供する。

【解決手段】 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ1 (Exo1) 領域を含有するDXEXXXH (D:アスパラギン酸、E:グルタミン酸、H:ヒスチジン、X:任意のアミノ酸) 配列のうち、ヒスチジンが他のアミノ酸、特にアスパラギン酸、グルタミン酸、チロシン、アラニン、リジン及びアルギニンのいずれかのアミノ酸に置換された耐熱性DNAポリメラーゼ、及び該耐熱性DNAポリメラーゼを用いる核酸増幅方法。

出 願 入 履 歴 情 報

識別番号 [000003160]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
氏 名 東洋紡績株式会社